

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTÉ DES SCIENCES

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCE
DE LA VIE SANTE ET ENVIRONNEMENT

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET
PHYSIOLOGIE ANIMALES



UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

CENTER FOR RESEARCH AND GRADUATE
STUDIES IN LIFE, HEALTH AND
ENVIRONMENTAL SCIENCES

DEPARTEMENT OF ANIMAL BIOLOGY
AND PHYSIOLOGY

LABORATOIRE DE PARASITOLOGIE ET ECOLOGIE

LABORATORY OF PARASITOLOGY AND ECOLOGY

**Caractérisation virologique des
variants de VIH circulant au
Cameroun : diversité génétique et
résistance aux antirétroviraux**

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat/Ph.D en Biologie des
Organismes Animaux

Option: Parasitologie et Ecologie

Par

NGO MALABO Elodie Téclair

Matricule : 08Q1226

Master en Biologie des Organismes Animaux

Sous

la Co- direction de

et

la Supervision de

KFUTWAH Anfumbom

Virologiste OMS

BILONG BILONG Charles Félix

Professeur Université de Yaoundé 1

NJOUOM Richard

Directeur de Recherche RIIP, CPC

Année 2020



REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix-Travail-Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES



REPUBLIC OF CAMEROON

Peace-Work-Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES

DEPARTMENT OF ANIMAL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

ATTESTATION DE CORRECTION DE LA THESE

Nous soussignés, membres du jury de soutenance de la thèse de Doctorat/Ph.D de Biologie des Organismes Animaux de Madame **NGO MALABO Elodie Teclaire**, matricule **08Q1226**, soutenance autorisée par la correspondance du Recteur de l'Université de Yaoundé I N° 2020-743/Uyl/VREPDTIC/DAAC/DEPE/SPD du 11 Décembre 2020 sur le sujet intitulé : « **Caractérisation virologique des variants VIH circulant au Cameroun : diversité génétique et résistance aux antirétroviraux** », attestons que les corrections demandées par les membres du jury ont été effectuées par la candidate. Le document peut donc, sous sa forme actuelle, être déposé pour exploitation ultérieure.

En foi de quoi la présente attestation est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Fait à Yaoundé, le **07 APR 2021**

L'Examineur

Pr. Wilfred J. Abraham
MS, DS, ScD (Harvard), FASL, FCAS
Public Health Biotechnologist

Le Président du jury

Fomena Abraham
Professeur

Le Chef du Département de BPA



Charles Felicia Bilong Bilong
Professeur

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I Faculté des Sciences Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I Faculty of Science Division of Programming and Follow-up of Academic Affairs
--	--	---

LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS / LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF

LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS DE LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE YAOUNDE I

ANNÉE ACADEMIQUE 2018/2019

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION 19 Février 2019

ADMINISTRATION

DOYEN : TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maitre de Conférences*

VICE-DOYEN / DPSAA : DONGO Etienne, *Professeur*

VICE-DOYEN / DSSE : AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Maître de Conférences*

VICE-DOYEN / DRC : ABOSSOLO Monique, *Maitre de Conférences*

Chef Division Administrative et Financière : NDOYE FOE Marie C. F., *Maître de Conférences*

Chef Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche DAASR : MBAZE

MEVA'A Luc Léonard, *Professeur*

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (37)

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
2	MBACHAM FON Wilfred	Professeur	En poste
3	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
4	NINTCHOM PENLAP V. épouse BENG	Professeur	En poste
5	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste

6	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
7	ATOGHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste
8	BELINGA née NDOYE FOE M. C. F.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
9	BIGOGA DIAGA Jude	Maître de Conférences	En poste
10	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
11	EFFA NNOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
12	FOKOU Elie	Maître de Conférences	En poste
13	KANSCI Germain	Maître de Conférences	En poste
14	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
15	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
16	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
17	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste

18	AKINDEH MBUH NJI	Chargée de Cours	En poste
19	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Chargée de Cours	En poste
20	BEBOY EDZENGUELE Sara Nathalie	Chargée de Cours	En poste
21	DAKOLE DABOY Charles	Chargée de Cours	En poste
22	DJOKAM TAMO Rosine	Chargée de Cours	En poste
23	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Chargée de Cours	En poste
24	DJUUKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste
25	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
26	EWANE Cécile Anne	Chargée de Cours	En poste

37	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistante	En poste
27	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
28	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
29	KOTUE KAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
30	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
31	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
32	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargée de Cours	En poste
33	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Chargée de Cours	Inspecteur de Service MINESUP
34	PACHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste
35	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
36	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Chargée de Cours	En poste

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (44)

1	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
2	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
3	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
4	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>VDoyen/FMSB/UIYI</i>
5	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
6	KAMGANG René	Professeur	<i>C.S. MINRESI</i>
7	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
8	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
9	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
10	NOLA Moïse	Professeur	En poste
11	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
12	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service Coord.Progr./MINSANTE</i>

13	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Maître de Conférences	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>
14	DZEUFUET DJOMENI Paul Désiré	Maître de Conférences	En poste
15	FOTO MENBOHAN Samuel	Maître de Conférences	En poste
20	JATSA BOUKENG Hermine épouse MEGAPTCHE	Maître de Conférences	En Poste
16	KEKEUNOU Sévilor	Maître de Conférences	En poste
17	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
18	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
19	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
21	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste
22	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Maître de Conférences	En poste

23	ALENE Désirée Chantal	Chargée de Cours	En poste
24	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
25	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste

26	BILANDA Danielle Claude	Chargée de Cours	En poste
27	DJIOGUE Séfirin	Chargée de Cours	En poste
28	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
29	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargée de Cours	En poste
30	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
31	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Chargé de Cours	En poste
32	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
33	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
34	MOUNGANG LucianeMarlyse	Chargée de Cours	En poste
35	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
36	NGOULATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
37	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste
38	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	Chef Div. UBA
39	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
40	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
41	YEDE	Chargé de Cours	En poste

43	ETEME ENAMA Serge	Assistant	En poste
44	KOGA MANG DOBARA	Assistant	En poste

3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (27)

1	AMBANG Zachée	Professeur	Chef Division/UYII
2	BELL Joseph Martin	Professeur	En poste
3	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
4	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
5	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste

6	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
7	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
8	DJOCGOUE Pierre François	Maître de Conférences	En poste
9	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
10	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
11	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	CT/UDs
12	MBOLO Marie	Maître de Conférences	En poste
13	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	CE / MINRESI
14	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	En poste
15	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste

16	GOMANDJE Christelle	Chargée de Cours	En poste
17	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
18	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
19	NGALLE Hermine BILLE	Chargée de Cours	En poste
20	NGOOU Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
22	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
23	ONANA JEAN MICHEL	Chargé de Cours	En poste
24	NSOM ZAMO Annie Claude épouse PIAL	Chargée de Cours	Expert national/UNESCO

25	TONFACK Libert Brice	Chargé de Cours	En poste
26	DJEUANI Astride Carole	Assistante	En poste
27	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Assistante	En poste

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (32)

1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Vice Recteur Univ ,Bamenda</i>
2	ELIMBI Antoine	Professeur	En poste
3	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ.Ngaoundere</i>
4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé deMiss.PR</i>
5	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
6	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI/Chef de Departement</i>
7	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i>
8	NENWA Justin	Professeur	En poste
9	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS UDs</i>

10	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée Mission P.R.</i>
11	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
12	KAMGANG YOUBI Georges	Maître de Conférences	En poste
13	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
14	KONG SAKEO	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
16	NGOMO Horace MANGA	Maître de Conférences	<i>Vice Chancellor/UB</i>
17	NJIOMOU C. épse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
18	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste
19	YOUNANG Elie	Maître de Conférences	En poste

20	ACAYANKA Elie	Chargé de Cours	En poste
21	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	CS/ ENS Bertoua
22	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
23	EMADACK Alphonse	Chargé de Cours	En poste
24	KENNE DEDZO GUSTAVE	Chargé de Cours	En poste
24	KOUOTOU DAOUDA	Chargé de Cours	En poste
25	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
26	MBEY Jean Aime	Chargé de Cours	En poste
27	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
28	NDI NSAMI Julius	Chargé de Cours	En poste
29	NEBA nee NDOSIRI Bridget NDOYE	Chargée de Cours	Inspecteur de Service MINFEM
30	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargée de Cours	En poste
31	PABOUDAM GBAMBIE A.	Chargée de Cours	En poste
32	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Chargé de Cours	En poste

5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (32)			
1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen / PSAA
2	GHOGOMU TIH Robert Ralph	Professeur	Dir. IBAF/UDS
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	En poste
4	NKENGFAK Augustin Ephreïm	Professeur	Chef de Département
5	NYASSE Barthélemy	Professeur	<i>Directeur/UN</i>
6	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP</i>
7	WANDJI Jean	Professeur	En poste

8	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	<i>DEPE/ Rectorat/UYI</i>
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	<i>Chef Service DPER</i>
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
11	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
13	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
14	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
15	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	Sous/Direct. MINERESI
17	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
18	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
19	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
20	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
21	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste

22	AMBASSA Pantaléon	Chargé de Cours	En poste
23	FOTSO WABO Ghislain	Chargé de Cours	En poste
24	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste
25	MVOT AKAK CARINE	Chargé de Cours	En poste
26	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
27	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Chargé de Cours	En poste
28	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Chargé de Cours	Chef Service/MINESUP
29	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
30	TAGATSING FOTSING Maurice	Chargé de Cours	En poste
31	ZONDENDEGOUMBA Ernestine	Chargée de Cours	En poste

32	NGNINTEDO Dominique	Assistant	En poste
----	---------------------	-----------	----------

6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (25)			
--	--	--	--

1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div.MINESUP</i>
2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Chef Dpt ENS/Chef IGA.MINESUP</i>

3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
---	---------------	-----------------------	----------

4	AMINOUE Halidou	Chargé de Cours	En poste
5	DJAM Xaviera YOUHEP KIMBI	Chargé de Cours	En Poste

6	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
7	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
8	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
9	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
10	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
11	KAMGUEU Patrick Olivier	Chargé de Cours	En poste
12	MONTHE DJIADEU Valery M.	Chargé de Cours	En poste
13	OLLE OLLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	C/D Enset. Ebolowa
14	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
15	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
16	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste

17	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
18	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Assistant	En poste
19	EBELE Serge	Assistant	En poste
20	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
21	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
22	KAMDEM KENGNE Christiane	Assistante	En poste
23	MAKEMBE. S. Oswald	Assistant	En poste
24	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistante	En poste
25	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (28)

1	BITJONG NDOMBOL	Professeur	<i>En poste</i>
2	DOSSA COSSY Marcel	Professeur	En poste

3	AYISSI Raoult Domingo	Maître de Conférences	Chef de Département
4	EMVUDU WONO Yves S.	Maître de Conférences	<i>CD Info/ Chef division MINESUP</i>
5	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
6	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	En poste
7	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	Directeur/AIMS Rwanda

8	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule MINPLAMAT
9	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
10	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
11	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
12	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
13	KIANPI Maurice	Chargé de Cours	En poste
14	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
15	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
16	MBANG Joseph	Chargé de Cours	En poste
17	MBEHOU Mohamed	Chargé de Cours	En poste
18	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Chargé de Cours	En poste
19	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste

20	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
21	NIMPA PEFOUNKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
22	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
23	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
24	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
25	TCHOUNDJA Edgar Landry	Chargé de Cours	En poste
26	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargée de Cours	En poste
27	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargée de Cours	En poste
28	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste

8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (12)

1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	DRV/IMPM
3	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
4	NWAGA Dieudonné M.	Maître de Conférences	En poste
5	NYEGUE Maximilienne Ascension	Maître de Conférences	En poste
6	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
7	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste
8	ASSAM ASSAM Jean Paul	Chargé de Cours	En poste
9	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
10	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
11	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
12	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
13	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste

9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (40)

1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
3	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
4	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
5	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	<i>Sous-Directeur/ MINRESI</i>
6	NJOMO Donatien	Professeur	En poste
7	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
8	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen Univ/Bda
9	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
10	WOAFO Paul	Professeur	En poste
	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	DG/HYDRO Mekin
14	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
12	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Maître de Conférences	En poste

15	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Maître de Conférences	<i>Chef Division. UN</i>
16	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
17	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
18	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
19	MBANE BIOUELE César	Maître de Conférences	En poste
20	NANA ENGO Serge Guy	Maître de Conférences	Director/Students/Affairs. UB
21	NANA NBENDJO Blaise	Maître de Conférences	En poste
22	NOUAYOU Robert	Maître de Conférences	En poste
23	SAIDOU	Maître de Conférences	Sous-Directeur/Minresi
24	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
25	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
26	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
27	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Sous Directeur/ MINESUP</i>
28	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste

29	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
30	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
31	ENYEGUE A NYAM épouse BELINGA	Chargée de Cours	En poste
32	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cell. MINADER
33	MBINACK Clément	Chargé de Cours	En poste
34	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
35	MEL'I Joelle Larissa	Chargée de Cours	<i>En poste</i>
36	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
37	NDOP Joseph	Chargé de Cours	En poste
38	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	DA/Univ Inter Etat/Sangmalima
39	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	En poste

40	CHAMANI Roméo	Assistant	En poste
----	---------------	-----------	----------

10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (43)

1	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FASA / UDs</i>
2	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
3	KAMGANG Pierre	Professeur	En poste
4	MEDJO EKO Robert	Professeur	<i>Conseiller Technique/UYII</i>

5	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	Chef de Département
6	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
7	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste

8	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
9	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	CD/UMa
10	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/ MINIMDT</i>
11	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Maître de Conférences	En poste
12	NGOS III Simon	Maître de Conférences	DAAC/Uma
13	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
14	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	En poste
15	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
16	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
17	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
18	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
19	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
20	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
21	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>
22	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>

23	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
24	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
25	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
26	ESSONO Jean	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
27	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
28	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
29	LAMILEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
30	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de Cours	En poste
31	MBIDA YEM	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
32	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	<i>CD/Uma</i>
34	MOUAFO Lucas	Chargé de Cours	En poste
35	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
37	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargée de Cours	En poste
38	NGUEUTCHOUA Gabriel	Chargé de Cours	CEA/MINRESI
39	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
36	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
40	TCHAKOUNTE J. épouse NOUMBEM	Chargée de Cours	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
41	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
42	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
43	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste

Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	5 (1)	12 (6)	19 (11)	1 (1)	37 (19)
BPA	12 (1)	10 (5)	20 (07)	2 (0)	44 (13)
BPV	5 (0)	10(2)	9 (04)	2(02)	26 (9)
CI	9(1)	9(2)	14 (3)	0 (0)	32 (6)
CO	7 (0)	14 (4)	10 (4)	1 (0)	32(8)
IN	2 (0)	1 (0)	13 (0)	10 (3)	26 (3)
MAT	2 (0)	4 (1)	19 (1)	2 (0)	27 (2)
MIB	2 (0)	5 (2)	5 (1)	0 (0)	12 (3)
PHY	10 (0)	17(2)	11 (3)	1 (0)	39 (5)
ST	7 (1)	15 (1)	21 (5)	1 (0)	43(7)
Total	61 (4)	97 (25)	141 (39))	19(6)	318 (75)

- 1 Soit un total de **318 (75)** dont :
- Professeurs **61 (4)**
 - Maîtres de Conférences **97(25)**
 - Chargés de Cours **141 (39)**
 - Assistants **18(5)**

2 () = Nombre de Femmes

DEDICACE

Je dédicace ce travail à ma mère

Mme. NGO NDOM Marie Derboise

REMERCIEMENTS

Je loue le **Seigneur Dieu le Père Tout Puissant** pour son amour et pour toutes les grâces qu'il m'accorde tous les jours.

Je ne saurais présenter ce travail sans dire merci:

- à **Dr KFUTWAH Anfumbom Kitu Womeyi** pour m'avoir fait confiance en me donnant ce sujet de recherche, pour m'avoir encouragée, enseignée la rigueur au travail, enfin pour avoir dirigé ce travail avec patience et dévouement. Qu'il trouve ici l'expression de toute ma gratitude ;
- à **Dr NJOUOM Richard** sans qui ce travail n'aurait pas pu être terminé. Merci pour l'intérêt qu'il y a consacré, pour tous les encouragements et surtout pour le suivi rigoureux de mes travaux ;
- au **Pr BILONG BILONG Charles Félix** pour avoir accepté de superviser ce travail, pour tout son soutien, ses conseils, sa disponibilité, sa patience et le regard critique de mon travail ;
- aux **Directions, Générale, Scientifique, Médicale et des Affaires administratives et Financières** du Centre Pasteur du Cameroun pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser mes travaux dans un Laboratoire de Référence ;
- au personnel du Service de Virologie du CHU de Rouen qui m'a accueillie pour la réalisation d'une partie de mes travaux. J'adresse un merci particulier au **Pr Jean-Christophe PLANTIER** et à Madame **Fabienne DE OLIVEIRA** qui m'ont suivie, accompagnée dans mes différentes manipulations et m'ont fait bénéficier de leur expérience au cours de mon séjour dans ce laboratoire ;
- à tous les **enseignants du Département de Biologie et Physiologie Animales de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I** pour tous les enseignements reçus. Je pense particulièrement au **Dr BELLET Roger** pour le rôle de guide qu'il a toujours joué auprès des étudiants et pour ses conseils et son soutien ;
- à chacun des membres du jury de cette thèse pour sa contribution à l'amélioration de la qualité de ce travail ;
- au **Dr TAGNOUKAM NGOUPO Paul Alain**, collègue et surtout ami, pour son implication à toutes les étapes de la réalisation de ce travail, sa disponibilité sans faille et pour m'avoir fait bénéficier de son expertise scientifique et social ;

- à l'ensemble des cadres scientifiques du Service de Virologie du CPC à savoir : **Dr SADEUH-MBA Serge Alain, Dr NGONO Laure, Dr ENDEGUE ZANGA Marie Claire, Dr KENMOE Sébastien**, à tous les **étudiants** et aux **techniciens de Laboratoire** de ce service pour leurs remarques, suggestions, expertises et multiples encouragements lors de la réalisation de ce travail ;
- à l'ensemble des personnes du **laboratoire de Parasitologie et écologie (laboratoire 164) de l'université de Yaoundé 1** pour leur franche collaboration dans la réalisation de ce travail.
- à mon époux **YANGOUA FOSSOU Marien Fridolin** et à nos fils **BELL YANGOUA Alexandre Manuel** et **YANGOUA YANGOUA Adrien Bryant** pour leur amour au quotidien et le bonheur qu'ils me procurent;
- à toute **ma famille**, et en particulier à ma sœur **NGO BELL Inès** et mes frères **MOUAHA BELL Olivier** et **DOUBA Apollinaire Franck**, pour leur soutien au quotidien ;
- à tous **mes amis**, et en particulier à mesdames **NYOBE ABEE Marie Manuella, AMOUGOU ATSAMA Marie, NGUIMFACK Sorelle** et **TOUSSE NGUEKE Kelly** pour leur soutien inébranlable et leurs encouragements au quotidien ;
- à tous **mes camarades de promotion en thèse**, pour leur compagnie et leur sympathie qui m'ont été d'un grand secours.
- Que ceux qui, de près ou de loin, ont contribué d'une manière ou d'une autre à la réalisation de ce travail trouvent ici le témoignage de ma gratitude.

SOMMAIRE

LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS DE LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I	i
DEDICACE.....	xi
REMERCIEMENTS	xii
SOMMAIRE	xiv
LISTE DES TABLEAUX	xvi
LISTE DES FIGURES	xvii
LISTE DES ABREVIATIONS	xviii
RESUME.....	xxi
ABSTRACT	xxiii
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : REVUE DE LITTERATURE	7
I.1. Généralités sur le VIH.....	8
I.1.1. Epidémiologie Virale.....	8
I.1.2. Structure du génome viral	11
I.1.3. Diversité génétique.....	19
I.2. Diagnostic, traitement et suivi de l'infection à VIH	35
I.2.1. Histoire naturelle du VIH	35
I.2.2. Diagnostic.....	37
I.2.3. Suivi.....	41
I.2.4. Traitement	42
I.3. Résistance du VIH aux ARVs.....	48
I.3.1. Concept de résistance	48
I.3.2. Méthodes de détermination des résistances et interprétations.....	51
I.3.3. Implication de la diversité génétique dans la résistance.....	53
CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES.....	56
II.1. Cadre et lieu d'étude	58
II.2. Populations d'étude.....	58
II.3. Méthodes	59
II.3.1. Dépistage du VIH et détermination des différents variants.....	59
II.3.2. Caractérisation moléculaire des variants non M obtenus	69
II.3.3. Réalisation des tests génotypiques de résistance du VIH aux ARVs	76

II.3.4. Analyses statistiques.....	78
CHAPITRE III : RESULTATS	79
III.1. Détermination de la fréquence de détection des différents variants du VIH circulant au Cameroun.	80
III.1.1. Echantillons reçus en routine au CPC	80
III.1.2. Echantillons de DBS collectés au cours de l'EDS 2011	83
III.2. Caractérisation moléculaire des variants non VIH-1/M détectés	86
III.2.1. Cas des échantillons de routine reçus au CPC.....	86
III.2.2. Cas des échantillons collectés au cours de l'EDS 2011	95
III.3. Détermination du profil de résistance et fréquence de détection des différentes mutations de résistance du VIH circulant au Cameroun	97
III.3.1. Identification des résistances du VIH chez les patients reçus en routine au CPC	97
III.3.2. Identification des résistances du VIH dans la population de l'EDS	106
CHAPITRE IV : DISCUSSIONS	111
IV.1. Détermination de la fréquence de détection des différents variants du VIH circulant au Cameroun.	112
IV.2. Caractérisation des variants non VIH-1/M.	115
IV.3. Détermination du profil de résistance et la fréquence de détection des différentes mutations de résistances du VIH circulant au Cameroun	118
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	128
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	131
ANNEXES	157

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Antigènes peptidiques utilisés pour le sérotypage	67
Tableau II : Résultats des sérologies VIH par catégorie	81
Tableau III : Risque associé à la diminution du nombre de patients VIH positifs de 2010 à 2016.....	82
Tableau IV : Répartition des différents variants VIH par année.....	83
Tableau V : Risque associé au nombre des doubles réactivités M+O avec le temps.....	83
Tableau VI : Répartition des différents variants de VIH en fonction des régions (villes) du Cameroun	84
Tableau VII : Récapitulatif des résultats obtenus avec les RT-PCRs VIH-1/M et VIH-1/O, sur échantillons dans les deux gènes en fonction des résultats du sérotypage	87
Tableau VIII : Détail des (RT-) PCRs des échantillons à profil de double infection VIH/M+O ou recombinant VIH-1/MO.....	90
Tableau IX : Résultats des PCR M et O réalisées sur les VIH-1/O de l'EDS 2011	95
Tableau X : Caractéristiques générales de la population considérée pour le test de résistance du VIH aux ARVs (N=295)	98
Tableau XI : Résistance du VIH aux différents ARVs	101
Tableau XII : Résistance aux différents traitements et aux molécules utilisées	103
Tableau XIII : Résistance des patients aux molécules administrées	104
Tableau XIV : Bilan des résultats du séquençage obtenus dans les deux régions	107
Tableau XV : Interprétation de la résistance observée au sein de la population de l'EDS	110

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Structure du VIH.....	12
Figure 2 : Schéma d'organisation du génome du VIH-1.....	13
Figure 3 : Cycle de réplication du VIH (adapté d'Engelman <i>et al.</i> , 2012).....	16
Figure 4: Diversité génétique du VIH-1, adaptée de Lihana <i>et al.</i> (Lihana <i>et al.</i> , 2012).	20
Figure 5 : Arbres phylogénétiques comparatifs des séquences de VIH-1/O (a) en forme de comète, (b) et en double étoile M.	22
Figure 6: Origine des virus du SIDA, (Sharp <i>et al.</i> , 2011).....	25
Figure 7: Relations phylogénétiques entre les lignées VIH-1, SIVcpz et SIVgor.	26
Figure 8: Processus de recombinaison d'après (E Simon-Lorière, 2006).	29
Figure 9: Génome représentant la structure mosaïque de CRF01_AE.....	31
Figure 10: Répartition géographique des sous-types et CRFs du VIH-1/M, (Santos <i>et al.</i> , 2010).....	33
Figure 11 : Cinétique d'apparition de l'infection par le VIH-1.....	36
Figure 12: Evolution des marqueurs de l'infection à VIH. (D'après Délaugère et Simon 2012)	37
Figure 13 : Profil comparatif des réactivités des différents groupes de VIH-1 au Western-Blot. (Mourez <i>et al.</i> , 2013).....	39
Figure 14 : Cinétique d'émergence d'un virus résistant au traitement administré (Pironti <i>et al.</i> , 2017a)	49
Figure 15 : Algorithme simplifié de dépistage sérologique du VIH et ses différents variants.....	60
Figure 16 : Profil des témoins positifs et négatifs (VIH 1 et 2) D'après mourez <i>et al.</i> , 2013	66
Figure 17 : Algorithme simplifié des analyses faites sur les deux types d'échantillons d'étudiées	75
Figure 18 : Cibles des différentes (RT-) PCR pour le test de résistance du VIH aux ARVs	78
Figure 19 : Arbres phylogénétiques construits avec (a) le gène gp41 (415bp), et (b) le gène IN (100pb) des VIH-1/O.....	89
Figure 20 : (a et b) Analyse de similarité (Simplot) des séquences PR+TI, IN et gp41 des deux échantillons présentant un profil recombinaison VIH-1/MO.....	92
Figure 21 : Arbre phylogénétique à partir des régions (a) gp41 (415bp) et (b) IN (649bp) du VIH-1/N séquencées.....	94
Figure 22 : Arbre phylogénétique construit à partir de la région protéase amplifiée et séquencée chez les VIH-2 positifs (100pb).....	95
Figure 23 : Arbre phylogénétique représentant les différents groupes de VIH-1/O sur la gp41de l'enveloppe (415pb).	96
Figure 24 : Taux de répartition des différents sous-types du VIH circulant dans la population étudiée.	99
Figure 25 : Différentes mutations observées chez les VIH circulant au sein des 295 patients reçus en routine au CPC	100
Figure 26 : Evolution du nombre de patients traités au Ténofovir, et de la résistance du VIH à cette molécule chez ces patients de 2013 à 2016.....	105
Figure 27 : Génotypes de VIH circulant dans la population de l'EDS.....	108
Figure 28 : Différentes mutations de résistances observées chez les VIH circulants au sein des 160 DBS analysés.....	109

LISTE DES ABREVIATIONS

- ABC : Abacavir
Ac : Anticorps
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
Ag : Antigène
ANRS : Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les hépatites virales
ARN: Acide RiboNucléique
Asp : « antisense protein gene »
ARVs: AntiRétroViraux
AZT: zidovudine
CDC: *Centre for Disease Control and Prevention*
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CNR : Centre National de Référence
CPC : Centre Pasteur du Cameroun
CRFs : *Circulating Recombinant Forms ou Formes Recombinantes Circulantes*
CV : charge virale
CVp : Charge Virale Plasmatique
DBS : *Dried Blood Spot*
d4T : Stavudine
DTG : Dolutegravir
EDS : Enquête Démographique de Santé
EDTA : Ethylène Diamine TetraAceticacid
EFV : Efavirenz
ELISA : *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*
EVG : Elvitegravir
FC : *Fold Change*
IC : Intervalle de Confiance
II : Inhibiteurs d'Intégrase
IIQ : intervalle interquartile
IDR : « Immuno-dominant region »
INNTI : Inhibiteurs Non Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse
INTI : Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse

Int : Intégrase
IP : Inhibiteurs de Protéase
kb : kilobase
IPP: Institut Pasteur Paris
LAV: *Lymphadenopathy Associated Virus*
LTR: *Long Terminal Repeat*
LPV/r: Lopinavir/ritonavir
Nef: *negative expression factor*
NVP: Névirapine
HTLV : *Human T-Lymphotropic Virus*
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ONUSIDA : Programme commun des Nations Unies sur le VIH/sida
OPD : Ortho-PhenylèneDiamine
pb : paire de bases
PBMC: *Peripheral Blood Mononuclear Cell*
PBS: Phosphate Buffer Saline
PCR: Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérisation en chaîne
PTME : Prévention de la transmission du VIH de la mère à l'enfant
PVVIH : Personne Vivant avec le VIH
PR : Protéase
RAL : Raltegravir
RAM: Resistance Associative Mutation
RPV : Rilpivirine
Rev : “Regulator of expression virion”
RRE: “Rev Responsive Element”
S/CO: Signal to cut-off
SIDA : Syndrome de l'Immuno-Déficience Acquise
SIV: Simian Immunodeficiency Virus
SLS: *Sample Loading Solution*
SVF_d : Sérum de Veau Foetal décomplémenté
TAM : Thymidina Analogue Mutation
Tat : *transactivator of transcription*
TARV : Traitement AntiRétroviral
TDR : Test de Diagnostic Rapide

TDF : Ténofovir

TI : Transcriptase Inverse

URFs : *Unique Recombinant Forms ou Formes Recombinantes Uniques*

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VIH-1/M : VIH-1 groupe M

VIH-1/N : VIH-1 groupe N

VIH-1/O : VIH-1 groupe O

VIH-1/P : VIH-1 groupe P

Vif : Viral Infection Factor

Vpu : Viral Protein u

Vpr : Viral Protein R

3TC : Lamivudine

RESUME

Du fait de sa grande diversité, le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) pose de nombreux problèmes dans le monde. Le Cameroun n'est pas en reste face à cette pandémie ; la dynamique de ce virus entraîne de nombreuses complications pour le diagnostic, le suivi ainsi que le traitement dans ce pays où les options thérapeutiques sont limitées. Dans l'optique d'atteindre les objectifs 90/90/90 fixés par ONUSIDA pour 2020, il est important de suivre l'évolution des proportions des différents variants de VIH circulants. A cet effet, nous nous sommes proposé de déterminer la fréquence de détection des variants de VIH circulant au Cameroun et leur profil de résistance aux antirétroviraux (ARVs).

Deux échantillons d'étude ont été utilisés. Le premier était constitué d'échantillons de plasma provenant des patients reçus en routine au Centre Pasteur du Cameroun (CPC), soit pour une demande de sérologie VIH, soit pour une demande de test de résistance du VIH aux ARVs, de la période allant de janvier 2010 à décembre 2016 et de septembre 2013 à décembre 2016 respectivement. Le second était composé de prélèvements de sang diagnostiqués VIH positifs au cours de l'enquête démographique de santé (EDS) de 2011. Les tests permettant la discrimination des sérotypes M, N, O, P, M+O et VIH-2 ont été réalisés. Les analyses moléculaires des gènes *pol* et *env* spécifiques de groupes de variants identifiés en sérotypie ont permis de confirmer les réactivités sérologiques et de rechercher des discordances *pol/env*, en faveur d'une forme recombinante. Enfin, le test de résistance du VIH aux ARVs pour le gène *pol* (protéase et transcriptase inverse) a été réalisé sur les échantillons concernés et les résistances ont été identifiées avec l'algorithme de l'ANRS.

De 2010 à 2016, parmi les 83253 patients reçus en routine au CPC pour un diagnostic sérologique au VIH, 24448 (29,4%) se sont avérés infectés. Le sérotypage a montré que 24079 (98,5%) de ces sujets positifs étaient mono-réactifs M, 119 (0,5%) mono-réactifs O, 1 (0,004%) mono-réactif N, 9 (0,04%) mono-réactifs VIH-2, 70 (0,3%) doublement réactifs M+O et 171 (0,7%) sérotypes indéterminés. Au fil du temps, les analyses ont indiqué une diminution significative du nombre de patients VIH positifs reçus au CPC, allant de 53,2% en 2010 à 15,5% en 2016 ($p=0,001$). Dans le même ordre d'idée, une augmentation significative du nombre de doubles réactivités VIH-1/M+O a également été observée ($p=0,001$). Grâce aux tests moléculaires, la double infection M+O a été confirmée chez un patient et la présence de recombinants M/O a également été identifiée.

Concernant les 295 patients infectés par le VIH et enregistrés au CPC pour le test de résistance aux ARVs, 203 (68,8%) étaient en échecs de traitement et la plupart (70,2%) étaient

en première ligne de traitement avec 3TC + TDF + EFV. Les analyses réalisées ont montré que ces patients étaient infectés avec les VIH de sous types non B (71%, CRF02_AG). Les mutations prédominantes observées sont M184V/I à 75,3% (222/295) et K103S/N/R à 47,8% (141/295) chez les inhibiteurs nucléosidiques et les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse respectivement. Aucune insertion au codon 69 n'a été identifiée. La résistance la plus observée dans la TI est celle à la Névirapine (76,6%) suivie par la Lamivudine (75,3%). Concernant les IP, une résistance de moins de 10% pour l'ensemble des molécules a été notée. Les analyses faites sur trois ans (2014 à 2016) ont montré une augmentation, avec le temps, du nombre de patients mis sous Ténofovir (51% en 2014, à 77% en 2016) $p=0,02$. L'évolution significative de la résistance à cette molécule a également été observée chez les patients en première ligne de traitement (3% en 2014 à 25% en 2016) $p=0,06$.

Les 673 échantillons conclus VIH positifs au cours de l'EDS de 2011 ont obtenu en sérotypie, 646 mono-réactivité M, 4 mono-réactivité O et 23 sérotypes indéterminés. La prédominance du variant M (CRF02_AG) a été observée dans toutes les régions du Cameroun. Par contre, les VIH-1/O obtenus sont du sous-groupe H et proviennent du Nord, de l'Adamaoua et du Centre.

Parmi les 673 VIH positifs de l'EDS, 294 ont pu être séquencés parmi lesquelles 160 (54,4%) sur les deux régions (protéase et transcriptase-inverse), 25 (8,5%) et 18 (6,1%) respectivement en protéase et revers-transcriptase uniquement pour le test de résistance du VIH aux ARVs. Globalement une faible résistance a été observée au sein de cette population. Les mutations prédominantes dans la région de protéase sont M36I, H69K et L89M (97,5%, 96,3% et 95% respectivement). Pour la transcriptase inverse, les mutations prédominantes étaient M184V (5,6%) suivie de T215Y (5%). La majorité des résistances dans la région TI étaient observée avec la Rilpivirine (8,1%). Dans la région protéase, la résistance prédominante est celle à la Saquinavir (8,1%).

Les résultats obtenus sur les deux populations d'étude confirment la prédominance du variant VIH-1/M, la présence du VIH-1/O et une très faible circulation du VIH-1/N au Cameroun. Cependant nous notons une diminution du nombre de VIH positifs au fil des années et une augmentation significative des probables doubles infections VIH-1/M+O. Une émergence de la résistance au TDF a également été observée. Ces données soulignent la nécessité de renforcer la surveillance de ces différents variants afin d'améliorer le diagnostic et le suivi des patients infectés au Cameroun et de prédire l'émergence de nouveaux variants.

Mots clés : Cameroun, VIH, Diversité génétique, Traitement, Résistance, Surveillance.

ABSTRACT

Due to its broad diversity, human Immunodeficient Virus (HIV) remains a major public health problem in the world. The dynamism of this virus in Cameroon involves many challenges on diagnosis, follow-up and treatment in this country where the therapeutic options are limited. To target the ONUAIDS 90/90/90 objectives for 2020, it is important to observe and analyse the evolution of these different strains circulating in Cameroon. This is why we described the distribution of different strains of HIV circulating in Cameroon and the resistance profile of these strains to antiretroviral treatment (ART).

Two groups of samples were used. The first consisted of plasma samples of patients who requested serological diagnosis of HIV between January 2010 and December 2016 or HIV genotyping resistance test between September 2013 and December 2016 on CPC. The second constituted all HIV positive blood collected in the framework of the Demographic Health Survey (DHS) of 2011 in Cameroon. The in-house serotyping test was performed to separate the different serotype of HIV (M, N, O, P, M+O and VIH-2). All the HIV non-M groups and doubles infections observed, were characterized by molecular test on the polymerase (*pol*) and envelope (*env*) genes to confirm the serological status. The discordance between *pol* and *env* genes, which favour the presence of recombinant forms were also analysed. The HIV genotypic resistance tests were done on *pol* region (Prot and RT) and only the specimen with positive amplification on these two regions were sequenced and analyzed for drug-resistant mutations using the French National Agency for research on HIV/AIDS and viral hepatitis algorithm.

Out of the 83253 patients routinely received at the CPC for HIV diagnosis between 2010 and 2016, 24448 (29.4%) were found to be infected. The serotyping test revealed that 24079 (98.5%) were mono-reactive M, 119 (0.5%) mono-reactive O, 1 (0.004%) mono-reactive N, 9 (0.04%) mono-reactive VIH-2, 70 (0.3%) doubles-reactive M+O and 171 (0.7%) indeterminate serotypes. Over time, analyses showed significant decrease in the number of HIV positive samples from 53.2% in 2010 to 15.5% in 2016 ($p=0.001$). In the same order, we also observed a significant increase in the number of HIV-1/M+O double-activity ($p=0.001$) (from 0.08% in 2010 to 2.11% in 2016). One double HIV infection M+O was confirmed in one patient with the molecular test, and the presence of recombinant M/O was also observed.

Of the 295 HIV-infected patients registered with the CPC for the ARV resistance test, 203 (68.8%) were of therapeutic failure. All these patients were infected with non B HIV subtype (CRF02_AG, 71%) and more than half of patients (70.2%) were on first-line ART with 3TC + TDF + EFV. On *pol* gene, the predominant mutations were M184V/I at 75.3% (222/295) and K103S/N/R at 47.8% (141/295) respectively in NRTI and NNRTI. No insertion on codon 69 was observed. Resistance to Lamivudine was commonly observed (75.3%) followed by Nevirapine (76.6%). Concerning protease Inhibitors (PI) globally, lower resistance was observed (less than 10% of resistance by drugs). With time, significant increase in the number of patients on TDF was observed (51.2% in 2014, to 77% in 2016) ($p=0.02$). Similarly, an important increase in virus resistance to TDF on patients in first line only was also observed with rates of 3% and 25% in 2014 and 2016 respectively ($p=0.02$).

Concerning 673 dried blood spots confirmed to be infected by HIV during DHS-2011, 646 were mono-reactive M, 4 mono-reactive O and 23 indeterminate serotypes. HIV-1/M was the predominant strains observed in all the regions of our country, and the four H subtype of HIV-1/O observed were identified in north, Adamawa and Centre of Cameroon.

Among the 673 dried blood spots analyzed for HIV genotyping resistance test, 294 were sequenced, with 160 (54.4%) on both regions (Prot and RT), and 25 (8.5%) and 18 (6.1%) respectively on Protease and reverse transcriptase regions only. Globally lower resistance was perceived in this population. The common mutations detected in reverse-transcriptase region were M184V (5.6%) followed by T215Y (5%). The current resistances present in this region were the resistance to Rilpivirine at 8.1%. As concerned protease region, the common mutations identified were M36I, H69K and L89M (97.5%, 96.3% and 95% respectively), and the predominant resistance was resistance to Saquinavir (8.1%).

To conclude, our results confirm the circulation of different strains of HIV in Cameroon with the predominance of HIV-1/M, the presence of HIV-1/O, and a very low flow of HIV-1/N. However we note a significant decrease in the number of patients infected by HIV over time and a significant increase in probable double infections of HIV-1/M + O. We also observed the likelihood of emergence of resistance to the TDF. These data highlight the need to strengthen the monitoring of HIV strains in order to improve the diagnosis and follow-up of infected patients in Cameroon and predict possible treatment failure, mainly in resource-limited settings where the therapeutics options are limited.

Key word: Cameroon, HIV, Genetic Diversity, Treatment, Resistance, Surveillance.

Introduction

Plus de 30 ans après sa découverte, l'infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) reste un problème majeur de santé publique dans le monde. L'Afrique subsaharienne est la partie du globe la plus touchée avec 25,7 millions de personnes infectées à la fin 2019 et elle comptait près de 70% des nouvelles infections dans le monde (WHO, 2020). Afin d'être plus efficace dans la lutte contre cette pandémie, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a standardisé les stratégies de lutte. C'est ainsi qu'un taux de $CD4 < 250$ cellules/mm³ de sang, utilisé comme principal critère de prise en charge des patients VIH positifs à partir de 2010, a laissé la place en 2013 à la charge virale (CV) qui, à son tour, a été remplacée en 2016 par la stratégie de « *test and start* » dans l'optique d'atteindre les objectifs 90/ 90/ 90 (c'est-à-dire 90% des personnes infectées par le VIH doivent connaître leur statut, 90% d'entre-eux doivent être sous traitement et 90% des personnes traitées doivent avoir une CV indétectable) fixés par l'ONUSIDA pour 2020 (ONUSIDA, 2014a).

Le VIH est un parasite cellulaire obligatoire qui s'attaque à toutes les cellules possédant les récepteurs CD4 mais majoritairement aux lymphocytes T helper. C'est un virus à ARN de la famille des Retroviridae, de la sous-famille des Orthoretrovirinae et du genre Lentivirus. Il est muni d'une enveloppe, matrice protectrice dans laquelle se trouve une nucléocapside, qui contient deux copies identiques d'ARN monobrin de polarité positive, dotées chacune d'une Transcriptase Inverse (TI) (Alter *et al.*, 2004). Le génome du VIH possède 9200 paires de bases (9,2 kb) constitutives de 3 gènes structuraux et de 6 gènes accessoires. Ces gènes structuraux sont communs aux autres rétrovirus à savoir : le groupe antigène (Gag) qui code pour la synthèse de la matrice, la capside et la nucléocapside ; la polymérase (*pol*) qui code pour la synthèse des enzymes telles que la protéase, la Transcriptase Inverse et l'intégrase ; et l'enveloppe (*env*) qui code pour la synthèse des protéines de l'enveloppe telles que la Gp120 et la Gp41. Les 6 gènes accessoires qui sont la Tat ou *transactivator of transcription*, la Rev ou *regulator of expression virion proteins*, la Nef ou *negative expression factor*, la Vif ou *viral infectivity factor*, la Vpr ou *viral protein R*, enfin la Vpu ou *viral protein U*, codent pour la synthèse des protéines régulatrices. L'infection des cellules par le VIH est possible grâce au mécanisme répliatif qui se met en place en même temps que le cycle de multiplication de la cellule hôte. De ce mécanisme de réplication du VIH découlent certains phénomènes tels que : une production assez élevée (de l'ordre de 10^{10} virus/jours) de variants viraux (Perelson *et al.*, 1996), un taux d'erreurs très élevé de la transcriptase inverse qui a la particularité de ne pas être fidèle durant la conversion de L'ARN viral en ADN (1,4 à 3×10^{-5} mutations par base et par cycle), et une possibilité de « switch (changement) » de la transcriptase inverse d'une copie d'ARN en une autre durant la rétro-transcription. Ces différents phénomènes sont à l'origine

des quasi-espères virales chez un même individu et responsables de la grande diversité génétique du VIH ainsi que de sa résistance aux antirétroviraux (ARVs).

Le Cameroun est l'un des pays de la sous-région d'Afrique Centrale qui connaît une situation épidémique très importante concernant l'infection à VIH bien que la séroprévalence de ce virus au sein de la population générale adulte soit passée de 5,5% en 2004 à 4,3% en 2011 selon l'enquête démographique de santé (EDS) de 2011 (INS-Cameroun, 2012). Selon cette enquête, le nombre de personnes vivant avec le VIH (PVVIH) au Cameroun a été estimé à environ 660.000 en 2011, parmi lesquelles plus de femmes (56%) que d'hommes (44%), avec d'importantes disparités géographiques. C'est dans la région du Sud (10,6%) que la prévalence du VIH a été plus élevée chez les femmes, alors que chez les hommes, c'est dans le Centre (5,3%) et à l'Ouest (5,0%) que la proportion des séropositifs a été la plus élevée. Dans la population générale, les régions du Sud (7,2%), de l'Est (6,3%) et du Nord-Ouest (6,3%) ont présenté les prévalences les plus élevées, tandis que les régions de l'Extrême-Nord (1,2%) et du Nord (2,4%) présentent les plus faibles valeurs. La situation de l'épidémie à VIH au Cameroun est en partie liée au faible niveau de connaissances de la maladie et aux comportements sexuels à hauts risques, notamment chez les jeunes de 15-24 ans. Par ailleurs, la connaissance du statut sérologique dans la population à risque est faible ; les données de l'EDS de 2011 ont révélé que la prévalence du VIH était très élevée parmi les veuves (17,9%), les divorcées/séparées (15,7%), et les veufs (10,6%). Une proportion encore importante de femmes infectées (30%) et d'hommes infectés (36%) n'ont jamais effectué de test du VIH ou l'ont effectué mais n'en connaissent pas le résultat. Chez 5,9% de couples, un seul des deux conjoints était séropositif, soit la femme (2,8%), soit l'homme (3,1%) ; de plus, chez 1,5% des couples, les deux conjoints étaient séropositifs. La prise en charge des personnes vivant avec le VIH/SIDA a néanmoins connu une nette amélioration grâce notamment à la gratuité des traitements ARV depuis mai 2007, associée à une diminution importante du coût du suivi biologique subventionné et de la charge virale (CV). Un accent particulier a été mis sur la prévention de la transmission du VIH de la mère à l'enfant (PTME), la promotion du dépistage volontaire et celle de l'utilisation du préservatif. Cependant, l'accès aux soins et aux équipements médicaux a été inégal, notamment dans les parties Nord et Est du pays.

Sur le plan moléculaire, le Cameroun se distingue par la forte diversité génétique du VIH, avec la présence des deux types VIH-1 et VIH-2 et de tous les groupes de VIH-1 (M, O, N et P) d'une part et, d'autre part, par l'existence de nombreuses formes recombinantes circulantes (CRFs) du groupe M, en plus des recombinants M/O (De Leys *et al.*, 1990; Simon *et al.*, 1998; J.C. Plantier *et al.*, 2009b; Vallari *et al.*, 2011; Mourez *et al.*, 2013; Ngoupo *et al.*,

2016). Parmi les variants de VIH-1 non-M, le VIH-1/O a été plus fréquent et représente 0,6% à 1% des infections à VIH (Vessiere *et al.*, 2010b; Villabona-Arenas *et al.*, 2015). Grâce à l'utilisation d'un important panel d'une centaine de séquences de VIH-1/O, Leoz *et al.* (2015) ont montré, sur une période de 25ans, une évolution de l'épidémie en deux phases d'expansion, calquées sur des évènements historiques du pays ayant conduit à la diversification des VIH-1/O en deux sous-groupes, H et T (Leoz *et al.*, 2015). Concernant le VIH-1/N, parmi les 20 souches identifiées à ce jour (Simon *et al.*, 1998; Roques *et al.*, 2004; Yamaguchi *et al.*, 2006b; Vallari *et al.*, 2010; Delaugerre *et al.*, 2011), seul un cas d'infection a été décrit hors du Cameroun, plus précisément en France, chez un patient d'origine togolaise (Delaugerre *et al.*, 2011). Le groupe P quant à lui a été découvert en France chez une patiente d'origine camerounaise âgée de 62 ans. La seconde souche a aussi été identifiée en 2006 au Cameroun, chez un homme de 54 ans hospitalisé à l'Hôpital Jamot de Yaoundé (Vallari *et al.*, 2011). La prévalence de ce dernier groupe au Cameroun semble très faible puisque estimée à 0,06% en 2011 (Vallari *et al.*, 2011). Des travaux de veille épidémiologique très récents ont confirmé cette tendance par un screening diagnostique sur 13700 échantillons collectés entre 2011 et 2015, au Sud Cameroun. Malgré une estimation de la prévalence à 0,015%, du fait de deux réactions sérologiques faisant évoquer un variant du groupe P, aucune de ces suspicions n'a été confirmée par les tests moléculaires appropriés (Rodgers *et al.*, 2017).

Au Cameroun, comme dans les autres pays de l'Afrique sub-saharienne, les protocoles de traitements utilisés sont ceux recommandés par l'OMS, à savoir: 2 inhibiteurs nucléos(t)idiques de la transcriptase inverse (INTI) + 1inhibiteur non nucléotidique de la transcriptase inverse (INNTI) en première ligne et 2 INTI+1IP (inhibiteur de protéase) en deuxième ligne de traitement. Les dernières recommandations du pays sur le traitement annoncent bien l'arrivée des inhibiteurs d'intégrase (INT) en troisième ligne de traitement en cas d'échec de la deuxième ligne. Le passage d'un patient d'une ligne de traitement à une autre préconise la réalisation d'un test de résistance du virus aux ARVs dans l'optique d'une adaptation du traitement. Cependant, malgré la standardisation des protocoles de suivi et la subvention actuelle des ARVs au Cameroun, le contrôle du suivi des patients infectés par le VIH reste fort difficile du fait des multiples problèmes de rupture de stocks des ARVs à disposition et de la mauvaise prise du traitement par les patients. De plus, le traitement aux ARVs est variant VIH dépendant ; Il a été démontré que plus de 60% des souches de VIH-1/O présentent une résistance naturelle aux INNTI due à la présence de la mutation Y181C dans la région TI du virus (Descamps *et al.*, 1997). Cette classe d'ARVs, largement utilisée dans les traitements de première ligne, conduirait le plus souvent à des échecs thérapeutiques sur les

variants du VIH-1/O. Ces différents paramètres font que la charge virale de plusieurs patients mis sous traitement reste très élevée et, par conséquent, est source des échecs thérapeutiques en raison de l'émergence des résistances qui sont la conséquence de l'apparition des mutations au cours de la réplication virale. Par contre le test de résistance, qui est une analyse assez complexe pouvant prédire ces différents cas d'échecs de traitement, n'est actuellement fait que dans certains laboratoires de référence ou dans le cadre de la recherche. Cette analyse est donc pratiquement inaccessible à la plupart des sujets infectés et mis sous traitement ; cette réalité constitue ainsi un gros problème dans le suivi des personnes vivant avec le VIH (PVVIH) au Cameroun, où la diversité génétique du VIH est bien établie.

Problématique et objectifs

La grande diversité du VIH au Cameroun est déjà bien démontrée avec la présence de tous les types de VIH (VIH-1 et 2), groupes de VIH-1 (M, N, O, P), et des CRF intragroupes et intergroupes. Cette diversité pose de nombreux problèmes dans le diagnostic et le suivi biologique et virologique des personnes infectées. Les VIH-1/O, par exemple, sont caractérisés par une très grande diversité génétique comparés aux VIH-1/M (Roques *et al.*, 2002; Leoz *et al.*, 2008). L'utilisation d'outils de diagnostic inadéquats pour le dépistage de ces variants conduirait à un grand risque de diagnostics sérologiques faussement négatifs (J.C. Plantier *et al.*, 2009a). Cette grande diversité impacte également sur la quantification virale (Gueudin *et al.*, 2003; Gueudin *et al.*, 2007). En effet, sans une identification spécifique préalable du variant, ces infections ne sont bien souvent suspectées que tardivement sur la base des discordances immuno ou clinico-virologiques. Cette diversité pourrait aussi être une source de mutations entraînant de nouvelles souches difficiles à diagnostiquer et résistantes aux traitements antirétroviraux (TARVs). L'absence d'identification du groupe mis en cause peut conduire à une mise sous traitement inadéquate du patient qui favorise l'émergence et la transmission de variants VIH résistants compromettant le succès thérapeutique. Cependant, les données sur la diversité génétique et sur les résistances des agents causals aux TARVs, au Cameroun, restent parcellaires et approximatives. Celles qui existent proviennent généralement des études portant sur des échantillonnages de convenance chez des patients qui visitent des formations sanitaires surtout dans les villes de Yaoundé et Douala. Cette situation entraîne un biais dans les estimations obtenues au Cameroun (Ahidjo Ayouba *et al.*, 2001; Vergne *et al.*, 2003; Yamaguchi *et al.*, 2004). La connaissance de la prévalence réelle des différents variants, la caractérisation moléculaire de ces derniers et l'identification de la fréquence de détections et du

profil de résistance de certaines mutations de résistance au sein de la population camerounaise serait un atout dans l'orientation des politiques de diagnostic et de suivi des PVVIH. De ce qui précède, nous avons défini trois principales questions de recherche à savoir :

- quelle serait la fréquence de détection des variants de VIH circulant au Cameroun?
- quelle serait le profil génétique des variants non M circulant au Cameroun?
- quelle serait le profil de résistance du VIH aux ARVs chez les patients naïfs ou en échec de traitement aux ARVs au Cameroun?

Ces Trois interrogations nous ont permis de poser les hypothèses suivantes :

- la fréquence de détection des variants de VIH circulant au Cameroun est variable en fonction des sous-populations cibles ;
- le profil génétique des variants de VIH serait très diversifié au Cameroun ;
- le profil de résistance de ce virus aux ARVs est fonction des sous-populations cibles.

L'objectif général de ce travail est donc de déterminer la fréquence de détection des variants de VIH et le profil de résistance de ce virus aux ARVs au Cameroun. Pour atteindre cet objectif principal, trois grands objectifs spécifiques ont été définis à savoir :

- déterminer la fréquence de détection des différents variants de VIH circulant au Cameroun;
- faire la caractérisation moléculaire des variants non VIH-1/M détectés ;
- déterminer la fréquence de détection des différentes mutations de résistance et le profil de résistance du VIH circulant chez les patients naïfs ou en échec de traitement aux ARVs.

Ce travail est divisé en quatre grands chapitres. Le premier chapitre est la revue de littérature où les connaissances générales sur le VIH sont développées ; il s'agit de sa découverte et des avancées réalisées en ce qui concerne le diagnostic, le suivi et le traitement. Ce chapitre se terminera par un aperçu sur les limites actuelles de la lutte contre ce virus, notamment les conséquences de la diversité génétique de ce virus et surtout le problème de résistance de ce virus aux ARVs auquel fait face le monde en général et les pays à ressources limitées en particulier. Le chapitre II résume les différentes méthodes utilisées dans ce travail pour atteindre nos objectifs. Le chapitre III regroupe les résultats obtenus. Enfin, les discussions seront assemblées dans le chapitre IV. Une conclusion et les perspectives clôtureront ce travail.



***Chapitre I : Revue de
littérature***

I.1. Généralités sur le VIH

I.1.1. Epidémiologie Virale

Depuis la caractérisation du Syndrome d'Immunodéficience Acquis (SIDA) (CDC, 1981; Malcolm *et al.*, 1983) puis la découverte successive de son agent causal à savoir le virus de l'immunodéficience humaine VIH (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983), l'infection à VIH a connu une expansion sans précédent et demeure l'un des principaux problèmes de santé publique dans le monde. A ce jour, plus de 70 millions de cas ont été recensés avec plus de 34 millions de décès enregistrés et une importante disparité géographique (WHO, 2018). L'Afrique subsaharienne, avec 25,6 millions de personnes infectées, est la région la plus sévèrement touchée et compte près de 70 % des nouvelles infections (WHO, 2018). La transmission par voie sexuelle est le moyen prépondérant de contamination ; cependant, on estime que les utilisateurs des drogues injectables font partie des populations les plus affectées. La transmission du VIH de la mère à l'enfant est un problème en Afrique subsaharienne où vivaient, en 2011, 90% des enfants infectés par ce virus (UNAIDS, 2012).

Grâce aux progrès récents concernant l'accès au traitement antirétroviral, les personnes séropositives vivent désormais plus longtemps et en meilleure santé car ce traitement prévient aussi la transmission du VIH. Au milieu de l'année 2017, 20,9 millions de sujets ont bénéficié d'un traitement antirétroviral dans le monde, ce qui a représenté 53% des 36,7 millions de patients alors porteurs du VIH (WHO, 2018). Malgré l'amélioration dans cette région de l'accès au traitement antirétroviral (TARV), la standardisation des protocoles de traitements, la promotion de l'usage des médicaments de forte barrière génétique et la révision des lignes directrices pour la mise sur TARV, l'Afrique sub-saharienne est toujours en marge de la lutte contre le VIH (WHO, 2013, 2015).

Le virus de l'immunodéficience humaine est un parasite cellulaire obligatoire ; il s'attaque à toutes les cellules possédant les récepteurs CD4 tels que les monocytes, les macrophages et surtout les lymphocytes T helper (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983). Cette infestation des cellules est possible grâce au mécanisme répliatif du virus qui se fait en même temps que le cycle de multiplication de la cellule hôte. La remarquable diversité génétique de ce virus et sa grande capacité d'évolution, du fait de son haut niveau d'adaptation à son hôte et à son environnement, contribuent à l'entretien de l'épidémie. L'OMS au fil des années publie un ensemble de lignes directrices et apporte son aide aux pays pour l'élaboration et la mise en

œuvre des politiques et programmes visant à améliorer et à renforcer les services de prévention du VIH, de traitement, de soins et de soutien pour tous ceux qui en ont besoin.

I.1.1.1. Découverte du VIH

En 1981, un cas de pneumonie à *Pneumocystis carinii* est observé à Los Angeles chez un sujet masculin, jeune, sans antécédents médicaux notables, mais présentant un effondrement d'une sous-population de lymphocytes T CD4 qui jouent un rôle majeur dans l'orchestration des défenses immunitaires (Gottlieb *et al.*, 1981). Quelques semaines après, d'autres cas de pneumocystoses, parfois associés à un sarcome de Kaposi jusqu'ici exceptionnel en Amérique du Nord et en Europe, sont répertoriés à Los Angeles et à New York chez des hommes jeunes tous homosexuels. Par la suite, le « Centre for Disease Control and Prevention » (CDC) publie une alerte sur cette épidémie d'infections pulmonaires à *Pneumocystis pneumonia*, des cas de sarcome de Kaposi, ainsi que d'autres infections opportunistes (pneumonies à CytoMegalovirus, encéphalites à toxoplasmes et/ou à CytoMegalovirus, résurgences sévères d'Herpès Simplex Virus et/ou de Varicella-Zoster Virus) associées à une immunodépression chez des homosexuels aux Etats Unis d'Amérique (USA) ; la dénomination Syndrome de l'Immuno-Déficiences Acquis, en abrégé SIDA, alors fut adoptée pour désigner les syndromes décrits (CDC, 1981). A cette époque, le SIDA concernait uniquement des homosexuels très actifs et utilisant des drogues contenant du nitrite d'amyle. La première hypothèse physiopathologique retenue pour expliquer la déplétion lymphocytaire a été la toxicité de ce composé pour les lymphocytes T CD4. Toutefois, des cas de SIDA ont encore été observés aux Etats-Unis chez des polytransfusés, des héroïnomanes et des haïtiens ; c'est alors qu'une nouvelle hypothèse a été proposée à savoir, celle d'un agent infectieux transmissible par le sang et les relations sexuelles.

En 1983, une équipe de l'Institut Pasteur de Paris (IPP) a isolé le virus responsable de cette immunodéficience, à partir d'une biopsie d'un ganglion prélevé chez un sujet homosexuel et ayant eu plusieurs partenaires sexuels aux Etats-Unis et présentant des lymphadénopathies. Ce rétrovirus avec un tropisme pour les lymphocytes T a été baptisé «Lymphadenopathy Associated Virus» en abrégé LAV (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983). La même année, Gallo *et al.* (1983) ayant isolé le même virus chez un patient américain l'ont baptisé «Human T-Lymphotropic Virus III» en abrégé HTLV-III à cause des similitudes de caractères avec les autres HTLV, bien qu'à l'inverse de ceux-ci, le HTLV-III causait une chute des lymphocytes T. D'autres isollements et des résultats sérologiques obtenus des patients présentant les symptômes de SIDA leur ont permis, en 1984, d'établir un lien de causalité entre ce virus et le

SIDA (Gallo *et al.*, 1983; Gallo *et al.*, 1984). Un virus semblable a été décrit chez des patients à San Francisco et a été nommé AIDS Related Virus en abrégé ARV (Levy *et al.*, 1984). Le virus du SIDA a donc eu trois dénominations (LAV, HTLV-III et ARV) selon les auteurs. Leur comparaison ayant montré qu'ils étaient des variants d'un même virus, le comité de nomenclature international des virus a, en 1985, établi un consensus sous le terme Human Immunodeficiency Virus en abrégé HIV-1 (Ratner *et al.*, 1985). D'autres travaux ont indiqué que le HIV-1, de son acronyme français VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) est distinct des HTLV et qu'il s'agit non pas d'un oncovirus mais d'un lentivirus.

Après la découverte du VIH-1, d'autres études ont montré la présence des anticorps anti-STLV-III_{mac} (rétrovirus des macaques apparentés au HTLV-III décrit par Gallo *et al.*) chez des patients sénégalais (Barin *et al.*, 1985a; Kanki *et al.*, 1986). Ensuite, en 1986, Clavel *et al.* (1986) ont isolé ce virus chez deux patientes sénégalaises atteintes de SIDA ; sa caractérisation a révélé qu'il était proche du STLV-III_{mac}, avec quelques différences antigéniques. Ces auteurs l'ont nommé LAV-II qui deviendra après la révision de la nomenclature, VIH-2 (Clavel *et al.*, 1986).

I.1.1.2. Classification

Le VIH appartient à la famille des Retroviridae ou des rétrovirus, qui comprend plusieurs virus de vertébrés largement répandus parmi diverses espèces animales. Les rétrovirus sont des virus à ARN enveloppés ; ils possèdent une enzyme caractéristique de leur famille, la transcriptase inverse (TI), qui leur permet de transcrire l'ARN viral en ADN capable de s'intégrer dans le génome de la cellule hôte. Les rétrovirus sont subdivisés en deux sous-familles :

- celle des Orthoretrovirinae qui regroupe les genres : Alpharetrovirus, Betaretrovirus, Deltaretrovirus, Gammaretrovirus, Epsiloretrovirus et Lentivirus ;
- celle des Spumaretrovirinae qui comprend le genre Spumavirus, identifié chez de nombreux mammifères, qui ne semble associé à aucune pathologie connue chez l'homme et les animaux.

Les virus de genre Lentivirus induisent des infections lentes. Ils infectent également de nombreux mammifères tels que le chat, la chèvre, le cheval et notamment les primates non-humains d'Afrique, tels que les singes verts d'Afrique, le sooty mangabey, le mandrill, le chimpanzé et le gorille (Keele *et al.*, 2006; Van Heuverswyn *et al.*, 2006; Sharp *et al.*, 2011). Chez ces espèces de singes, ils sont dénommés Simian Immunodeficiency Virus, en abrégé

SIV. Les lentivirus de primates sont actuellement répartis en 6 lignées phylogénétiques distinctes à savoir les: SIVsm pour sooty mangabey, SIVcpz pour chimpanzee, SIVagm pour african green monkey, SIVsyk pour syke's monkey, SIVmnd1 pour mandrill associé au SIVlhoest et SIVsun, et SIVcol pour colobus (Courgnaud *et al.*, 2003). La plupart de ces SIVs infectent naturellement l'hôte sans engendrer de pathologie ; cependant le transfert d'une espèce d'hôtes donnée à une autre peut les rendre pathogènes, c'est le cas des macaques infectés en captivité par des "sooty mangabeys".

L'existence de différences génétiques entre les virus responsables du SIDA a permis d'identifier les deux variants: VIH-1 et VIH-2. Le VIH de type 1 (VIH-1) a été mis en évidence pour la première fois chez un patient homosexuel avec des lymphadénopathies multiples (Vessiere *et al.*, 2010b). Quant au VIH de type 2 (VIH-2), suspecté initialement à partir de la réactivité sérologique particulière d'échantillons issus des sénégalaises (Mourez *et al.*, 2013), il a finalement été isolé à l'origine des prélèvements de deux patients en stade SIDA (Clavel *et al.*, 1986). Bien que partageant des caractères morphologiques et biologiques communs, le VIH-2 se distingue du VIH-1 par la nature des glycoprotéiques d'enveloppe et une composition antigénique singulière (Barin *et al.*, 1985b; Guyader *et al.*, 1987). La nomenclature, qui s'est enrichie au fil de multiples caractérisations moléculaires, rend compte des propriétés génotypiques et phénotypiques distinctes de chaque virus.

I.1.2. Structure du génome viral

Bien qu'ayant quelques différences sur leurs propriétés aussi bien génotypiques que phénotypiques, le VIH-1 et le VIH-2 ont la même structure et, à quelques différences près, le même génome et le même cycle répliatif.

I.1.2.1. Structure

Le VIH est un virus à ARN dont le diamètre est compris entre 80-120 nm. Son génome est constitué de deux molécules d'ARN identiques de 9,2 kb, composées d'une portion codante flanquée à chaque extrémité par des séquences non codantes répétées dites « *Long Terminal Repeat* » en abrégé LTR (Paillart *et al.*, 2004). Il possède une capsidie icosaédrique et une enveloppe provenant de la cellule hôte. L'ARN viral est associé à la transcriptase inverse dans un "core" cylindrique composé d'une protéine p24 de 24 kilodaltons. La matrice virale (MA) constituée de la p17 située entre le "core" et l'enveloppe, est une émanation de la membrane cytoplasmique qui porte des glycoprotéines virales: gp41 en position transmembranaire et gp120 à la surface du virus; cette glycoprotéine120 permet la fixation du virus à son récepteur cellulaire (fig. 1).

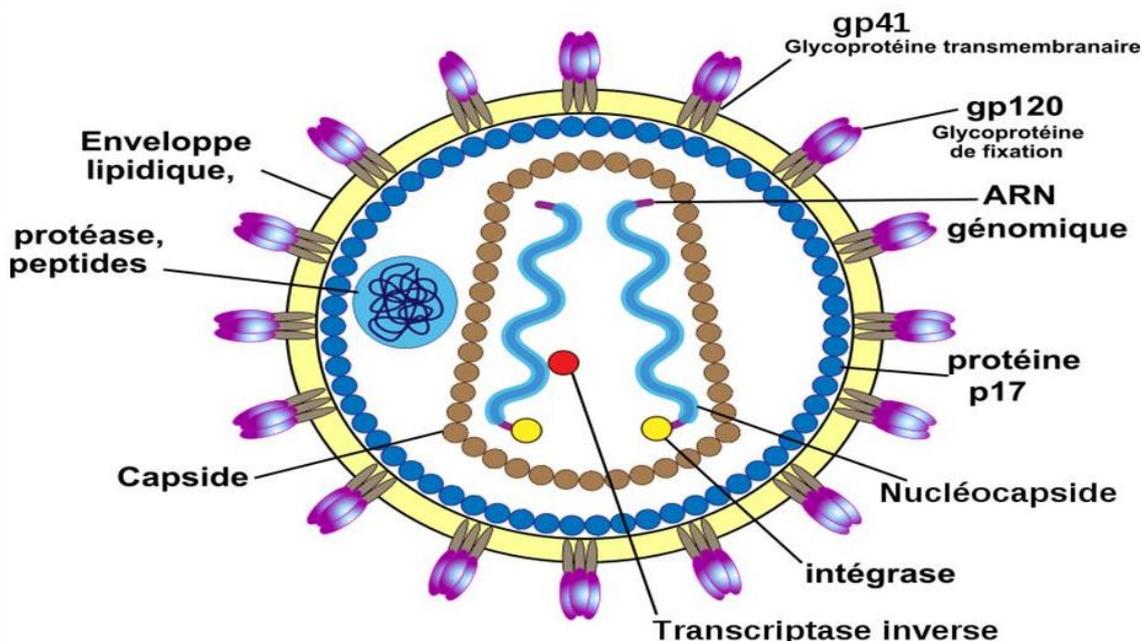


Figure 1: Structure du VIH

Source : <http://svt-oehmichen.over-blog.fr/2015/11/carte-d-identite-du-v-i-h.html> (Page consultée le 03/07/2018). Dans la structure tridimensionnelle de la particule virale, les différentes protéines du VIH sont représentées. Les protéines dérivées du gène *gag* (p6, p7, p17 et p24), les enzymes dérivés du gène *pol* (Protéase, Transcriptase Inverse et Intégrase) et les glycoprotéines de l'enveloppe dérivées du gène *env* (gp41 et gp120) sont également précisées.

I.1.2.2. Génome

Le génome du VIH est un ARN monocaténaire d'environ 9,2 kb possédant trois cadres de lecture ouverte (fig. 2). Il compte neuf gènes dont trois gènes principaux (*gag*, *pol* et *env*) communs à tous les rétrovirus, codant pour les protéines de structure, et six gènes secondaires ou accessoires (*vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev* et *nef*) qui sont propres au VIH-1. Les gènes *gag* (groupe antigène) et *env* (enveloppe) codent pour les protéines et les glycoprotéines structurales, alors que le gène *pol* (polymérase) code pour les différentes protéines fonctionnelles (enzymes).

Chez le VIH-2, le gène *vpr* est remplacé par le gène *vpx*. Récemment, Cassan *et al.* (2016) ont décrit un dixième gène appelé *asp* (*antisense protein gene*), spécifique au VIH-1 groupe M, qui pourrait être associé à la pandémie à VIH-1 (Cassan *et al.*, 2016).

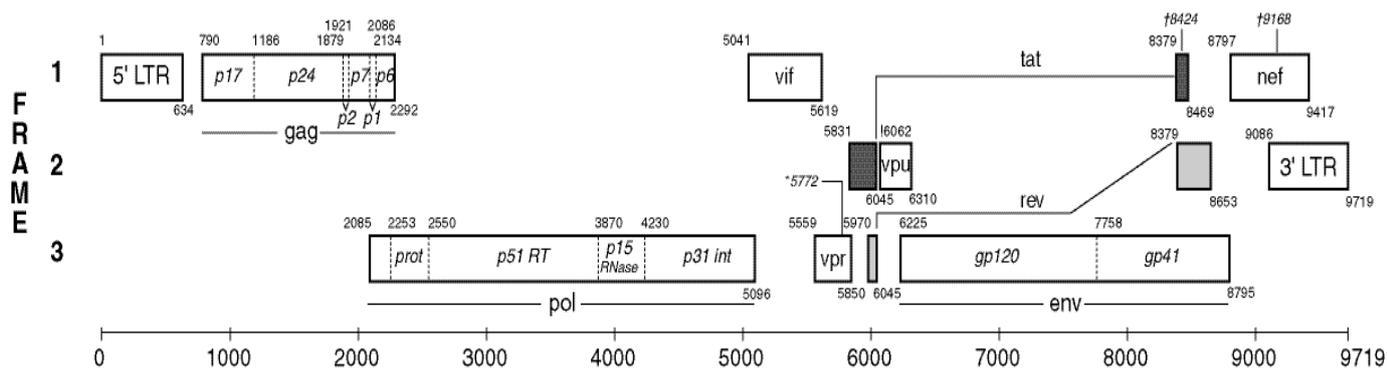


Figure 2 : Schéma d'organisation du génome du VIH-1.

Source : <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/IMAGES/hxb2genome.gif> (Page consultée le 04/07/2018). L'échelle correspond au nombre de bases nucléotidiques et les chiffres en gras aux 3 cadres de lecture (FRAME). Les différents gènes du VIH-1, ainsi que leur position sur le génome, sont représentés. Les protéines codées par ces différents gènes sont représentées au niveau du gène correspondant. La région LTR est présente aux extrémités 5' et 3' du génome.

➤ Le gène *gag*

Ce gène code pour la synthèse de la polyprotéine p55Gag protéine de 55 Kda. Il est encore appelé « assembline » à cause du rôle qu'il joue dans l'étape d'assemblage lors de la réplication virale. Il comprend trois polyprotéines distinctes ayant chacune un rôle dans l'assemblage d'une capsid immature puis le relargage des virions immatures dans le milieu extracellulaire (Sakalian *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 2001); il s'agit principalement de :

- p17 (MA) ou protéine de matrice. Elle tapisse la face interne de l'enveloppe et intervient à l'étape du bourgeonnement des virions par le ciblage de la membrane plasmique ;
- p24 (CA) ou protéine de capsid. Elle intervient à l'étape d'assemblage et permet des interactions critiques de type Gag-Gag. Cette protéine est recherchée dans le diagnostic précoce de l'infection à VIH ;
- p15 (NC) ou protéine de nucléocapsid. Elle est clivée en deux protéines la p6, qui intervient à l'étape de la libération des virions, et la p7 qui interagirait avec le génome du virion et aurait une action dans l'initiation de la transcription inverse.

➤ Le gène *pol*

Ce gène code pour une protéine de fusion p160Gag-Pol dont le clivage aboutit aux trois enzymes majeures du cycle de réplication virale : la protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase.

La protéase ou p11 (PR) est un homodimère de 99 acides aminés qui appartient à la famille des protéases aspartiques (Weber *et al.*, 1989). Son site actif est constitué de plusieurs feuillets bêta et d'une hélice alpha. La flexibilité engendrée par le feuillet bêta de chaque

monomère forme deux rabats qui restreignent l'accessibilité au site actif. A l'état libre, les rabats de l'enzyme sont en position ouverte (Toth *et al.*, 2006b) mais la présence du ligand sur le site actif induit une conformation en position semi-fermée (Toth *et al.*, 2006a). Ce ligand est essentiel dans l'assemblage et la maturation de la particule virale. Il est aussi responsable du clivage des précurseurs polyprotéiques p55Gag et p160Gag-Pol et de certaines protéines cellulaires pour favoriser la mort cellulaire par apoptose et nécrose (Levy, 1993), contribuant *in fine* à la déplétion des cellules CD4.

La transcriptase inverse (TI) ou p51/66 assure la transcription de l'ARN viral en ADN proviral capable de s'intégrer à l'ADN de la cellule hôte. Cette enzyme TI est un hétérodimère composé de deux sous-unités : la p66 et la p51. La p66 contient les sites actifs qui assurent les deux fonctions de l'enzyme, à savoir : l'activité ADN polymérase ARN/ADN dépendante, qui assure la transcription de l'ARN en ADN, et l'activité RNase H, qui dégrade la matrice ARN lors de la transcription inverse. La p66 joue ainsi un rôle catalytique alors que la p51 joue un rôle structural (Hu *et al.*, 2012). L'absence d'activité 3'-5' exonucléasique de la TI est responsable du fort taux d'erreurs générées au cours de la transcription inverse, facteur déterminant de la grande variabilité génétique observée chez le VIH.

L'intégrase ou p31 (Int) comprend 288 acides aminés et 3 domaines indépendants (Asante-Appiah *et al.*, 1997): le domaine N-terminal constitué d'environ 50 acides, le core catalytique central qui est un domaine hautement conservé et site clé de l'activité enzymatique, enfin le domaine C-terminal qui est la structure dimérique la moins conservée au sein des intégrases des rétrovirus (Eijkelenboom *et al.*, 1995; Lodi *et al.*, 1995). L'acétylation post-traductionnelle de quatre lysines de ce domaine régule l'ensemble des étapes d'intégration et induit un déclin de la réplication du virus (Cereseto *et al.*, 2005). Ces composants assez complexes de l'Intégrase permettent d'assurer l'intégration de l'ADN proviral (provirus) dans le génome de la cellule hôte.

➤ Le gène *env*

Le gène *env* code pour la synthèse d'une polyprotéine-précurseur trimérique, la gp160, clivée par une protéase cellulaire en deux glycoprotéines d'enveloppe : la gp120 en surface et la gp41 transmembranaire.

La gp120 (SU) est indispensable à l'étape de fixation de la particule virale sur la cellule cible. Elle mesure 120 kDa et formée d'environ 500 acides aminés répartis en cinq régions conservées (C1 à C5) et variables (V1 à V5). Elle interagit avec les récepteurs CD4 et les corécepteurs CCR5 et CXCR4. La boucle V3 présente une hypervariabilité importante (Hioe *et*

al., 2010). Il a été démontré qu'elle est un déterminant majeur pour le tropisme cellulaire et le principal déterminant des phénotypes SI (induisant des syncytia *in vitro* et associé à l'utilisation du CXCR4) et NSI (n'induisant pas de syncytia et associé à l'utilisation du CCR5) (de Jong *et al.*, 1992; Holm-Hansen *et al.*, 2000).

La gp41 (TM) est responsable de la fusion entre la particule virale et la membrane cytoplasmique de la cellule cible. C'est une glycoprotéine transmembranaire de 41 kDa qui s'associe de façon non covalente à la gp120 externe pour assurer l'ancrage membranaire du virus à la cellule hôte. La région antigénique de la gp41 est appelée épitope immuno-dominant (IDR pour « immuno-dominant region »). De structure trimérique, son unité fonctionnelle est composée de trois domaines : un ectodomaine extracellulaire (HR2), une région transmembranaire centrale (HR1) et une queue cytoplasmique. Sa conformation en faisceau de six hélices est destinée à rapprocher les membranes cellulaires et virales pour permettre leur fusion et la libération intracytoplasmique du contenu viral.

➤ Les gènes accessoires

Le VIH possède aussi six gènes accessoires qui lui sont propres et codent pour des protéines jouant, chacune, un rôle dans la régulation de la réplication et le pouvoir pathogène du virus. Elles assurent un rôle important dans l'établissement de l'infection, et semblent induire une action d'adaptation moléculaire du virus pour détourner les mécanismes de défenses de la cellule hôte, tels les facteurs de restriction (Strebel, 2013). Il s'agit du :

- *vif* (viral infectivity factor) ou protéine Vif qui est une protéine cytoplasmique, augmentant l'infectivité du virus ;
- *vpr* (viral protein R) qui est une protéine incorporée au virion. Elle interagit avec le précurseur p55Gag et intervient dans le transport du complexe de pré-intégration vers le noyau. Elle jouerait un rôle de transactivateur de certains gènes cellulaires, son homologue chez le VIH-2 est le gène *vpx* ;
- *vpu* (viral protein U), c'est une protéine qui a deux fonctions principales : la dégradation des molécules de CD4 dans le réticulum endoplasmique, d'une part, et la libération des virions, d'autre part ;
- *tat* (transactivator of transcription) il représente l'un des facteurs essentiels de régulation du virus. Il se lie au TAR (« TransActivation Response ») et active le promoteur LTR en empêchant le signal de polyadénylation 5'LTR AATAAA, qui est responsable de la terminaison prématurée de la transcription. Il joue un rôle dans la régulation positive du taux d'ARNm et la production de virus ;

- *rev* (« *regulator of expression virion proteins* ») est l'autre facteur essentiel de régulation du virus qui est localisé dans le noyau des cellules. Il interagit avec la séquence RRE « *Rev Responsive Element* » située dans le gène *env* et permet la stabilisation des ARNm et leur transport vers le cytoplasme avant leur traduction ;

- *nef* (« *negative expression factor*») qui est une protéine qui jouerait un rôle dans la régulation négative des récepteurs CD4 et du CMH classe I. Elle aurait également un impact sur l'infectivité du virus.

➤ LTR (Long Terminal Repeat)

La séquence LTR est présente aux extrémités 5' et 3' de l'ADN proviral. Chacune d'elle est formée de trois régions, U3, R et U5, qui participent à l'intégration de l'ADN proviral à l'ADN cellulaire. Une fois le provirus intégré, la LTR joue le rôle de promoteur de la réplication virale en interagissant avec différents éléments trans-activateurs viraux et cellulaires.

I.1.2.3. Cycle réplcatif

Le cycle réplcatif du VIH se déroule en plusieurs étapes représentées dans la figure 3.

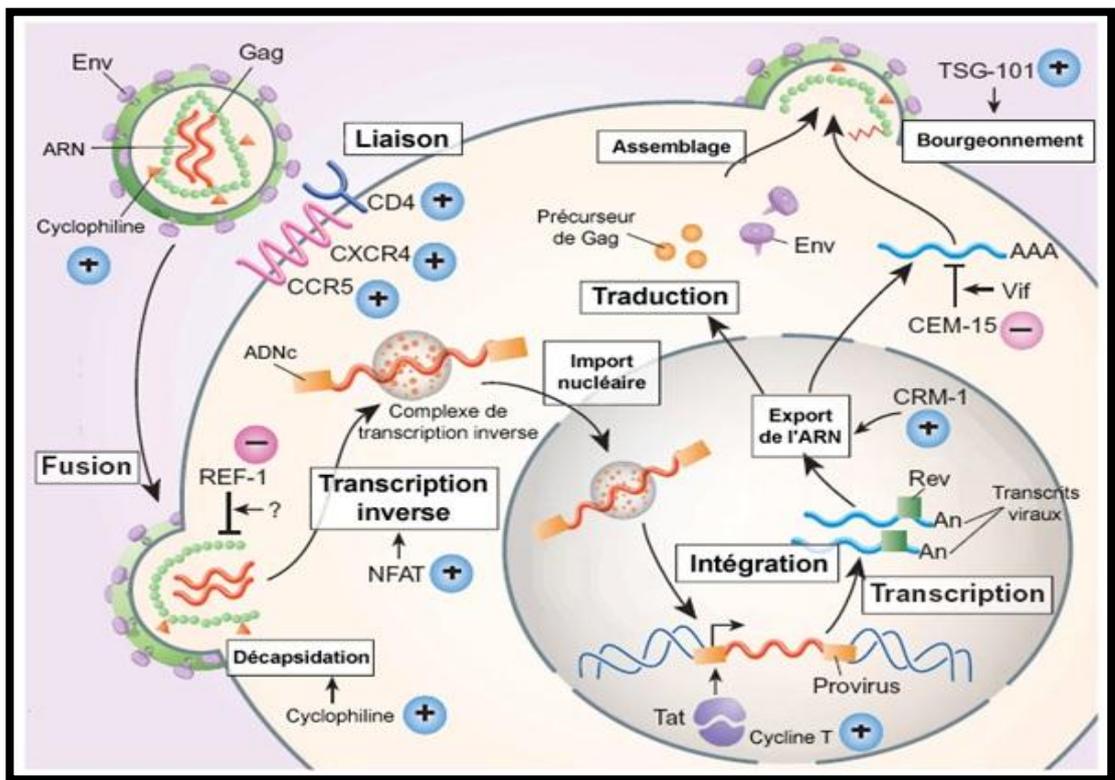


Figure 3 : Cycle de réplication du VIH (adapté d'Engelman *et al.*, 2012).

Les différentes étapes sont indiquées en gras. L'ADN proviral est représenté en orange et l'ADN cellulaire en bleu.

➤ Adsorption et fusion

La particule virale se fixe aux récepteurs CD4 de la cellule cible par l'intermédiaire de sa glycoprotéine gp120, ce qui entraîne des modifications de conformations des protéines et permet à la gp120 de se fixer sur un corécepteur (CCR5 ou CXCR4). Cette fixation expose la protéine gp41, qui libère un peptide de fusion. Ce dernier peut alors s'insérer dans la membrane plasmique et opérer la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane cellulaire, permettant la libération de la capsid dans la cellule cible. Les corécepteurs, CCR5 et CXCR4, appartiennent à la super-famille des récepteurs couplés aux protéines G et sont outre l'infection liée au VIH impliqués dans de nombreuses autres pathologies telles que les affections neurologiques, les inflammatoires chroniques et le cancers (Choi *et al.*, 2011).

➤ Décapsidation

Après l'adsorption de la particule virale et la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire, la capsid du VIH pénètre dans le cytoplasme de la cellule hôte ; elle y est dégradée en libérant les deux copies d'ARN et les enzymes qu'elles contenaient dans le compartiment intra-cytoplasmique.

➤ Transcription inverse

Une fois l'ARN linéaire monocaténaire viral est libéré dans le cytoplasme, la TI synthétise, grâce à son activité ADN polymérase, un brin d'ADN complémentaire (ADNc) à partir de cette matrice ARN. Ensuite, le deuxième brin d'ADN est synthétisé à partir de l'ADNc, pour former une molécule d'ADN double brin qui s'intègre dans le génome de la cellule hôte. Plusieurs résidus protéiques en position 65, 115 et 151 (respectivement nommés K65, Y115 et Q151) ont un intérêt dans la formation du site de liaison au nucléotide, comme le motif YXDD conservé de la TI qui induit, lorsqu'il est muté, la suppression de l'activité enzymatique et diminue l'infectiosité du virus (Huang *et al.*, 1998).

➤ Intégration

Le complexe de pré-intégration, constitué de l'ADN double brin, de la protéine de matrice, de la TI, de l'Intégrase et de la protéine *vpr*, permet au virus de franchir la membrane nucléaire. L'intégration de l'ADN proviral à l'ADN cellulaire est catalysée par l'Intégrase qui conduit au clivage des extrémités de l'ADN proviral puis de l'ADN cellulaire en une première étape de terminaison en 3' ou « *3' end processing* » exposant alors des terminaisons CAOH-3'. La seconde étape de transfert du brin d'ADN ou « *DNA strand transfer* » permet une liaison entre le groupement hydroxyl libre de l'ADN viral et les groupements phosphodiester de l'ADN cellulaire. Il en résulte un intermédiaire d'intégration où l'extrémité 3' de l'ADN viral est liée de manière covalente à l'ADN cible. Des enzymes cellulaires interviennent ensuite pour

finaliser la ligation de l'extrémité 5' de l'ADN viral (Ellison *et al.*, 1994). C'est une étape essentielle du cycle viral qui permet l'archivage de l'information génétique virale dans la cellule hôte.

➤ Transcription et synthèse des protéines virales

Lorsque la cellule est activée, l'ADN viral intégré (provirus) est transcrit en ARN grâce à la machinerie enzymatique de la cellule. Ces ARNs servent à la synthèse des protéines virales et de l'ARN génomique des nouveaux virions. Les séquences d'ARN excisées/épissées deviennent des ARNm qui sont traduits en protéines par la machinerie enzymatique de la cellule. C'est ainsi que :

- les glycoprotéines de l'enveloppe sont synthétisées ; elles migrent puis s'incorporent dans la membrane de la cellule ;
- les protéines de la capsid, sous forme de précurseurs indifférenciés (protéines Gag et Gag-Pol), s'amarrent à la face interne de la membrane cellulaire. A ce stade la protéase virale se détache de la protéine Gag-Pol par autoclivage et clive à son tour les précurseurs Gag et Gag-Pol.

➤ Assemblage et bourgeonnement

Tous les éléments du virion et son ARN sont encapsidés. Le processus de maturation, piloté par la protéase virale, dure jusqu'à l'assemblage définitif de la capsid. Dès lors, les nouveaux virions sont libérés par bourgeonnement en emportant un fragment de la membrane cellulaire, avec les glycoprotéines de l'enveloppe qui y sont préalablement incorporées.

I.1.2.4. Cellules cibles et physiopathologie de l'infection par VIH

Le VIH parasite le système immunitaire en utilisant à son propre compte diverses molécules de ce système. La sélectivité du tropisme de ce virus et la sévérité du déficit immunitaire induit par l'infection sont liées, en grande partie, à l'interaction spécifique entre la glycoprotéine de l'enveloppe du VIH, la gp120, et la molécule CD4, récepteur de haute affinité à ce virus. Le récepteur CD4 est une protéine membranaire exprimée abondamment à la surface des lymphocytes T auxiliaires. Ces derniers sont responsables de l'initiation de la réponse T auxiliaire et de l'amplification des diverses fonctions du système immunitaire. La molécule CD4 est également exprimée, bien qu'à moindre degré, sur les cellules présentatrices d'antigènes qui sont les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, microgliales et de Langerhans. Toute cellule humaine dotée de récepteurs CD4 est capable de fixer le VIH, même si l'interaction CD4/gp120 n'est pas toujours suffisante pour permettre l'infection. Le VIH, par son tropisme pour le CD4, infecte ainsi les cellules centrales du système immunitaire.

Des co-récepteurs (CCR5 et CXCR4), en association avec le récepteur CD4, sont nécessaires pour l'entrée du virus dans la cellule (Alkhatib *et al.*, 1996; Choe *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1996). Il s'agit des récepteurs à chimiokines, membres de la super-famille des cytokines classés suivant la séparation des cystéines conservées par un acide aminé (CXC), ou aucun (CC). Le CCR5 est le co-récepteur des souches virales à tropisme macrophagique ; il est un récepteur naturel des chimiokines MIP1 et RANTES. Quant au CXCR4, c'est le co-récepteur des souches virales à tropisme lymphocytaire T ; il a pour ligand naturel la chimiokine SDF-1. On pense que la primo-infection est faite avec des souches à tropisme macrophagique (M) puisqu'au fur et à mesure des cycles de réplication et des mutations virales, les souches acquièrent un tropisme pour les lymphocytes T. La nature et l'intégrité des co-récepteurs sur les cellules cibles peuvent être des déterminants importants de la progression de la maladie. Les souches qui utilisent le CXCR4 (X4) induisent la formation de syncytia SI (Syncytium Inducing), alors que les souches qui utilisent le CCR5 (R5) n'induisent pas la formation de syncytia (NSI, Non-Syncytium Inducing). Certains isolats ont un double tropisme M et T, avec l'usage des 2 co-récepteurs (R5X4). La primo-infection est limitée aux souches avec un phénotype R5/NSI puis les variants X4/SI généralement évoluent durant la phase chronique.

I.1.3. Diversité génétique

Les VIH sont divisés en deux types : le VIH-1 et le VIH-2. Le VIH-1 est le plus répandu dans le monde et responsable de la pandémie actuelle à VIH. Le VIH-2 quant à lui restreint sa distribution en Afrique de l'Ouest et en Asie (Ayoub *et al.*, 2013). Les études menées sur le VIH ont permis la mise en évidence d'autres variants au sein du VIH-1 et leur subdivision en groupes.

I.1.3.1. Variants du VIH-1

La première souche de VIH (HXB2) décrite à l'IPP a constitué le prototype du VIH, retrouvé chez la plupart des patients infectés. A la suite de, la découverte des variants divergents du groupe O (outlier) (Charneau *et al.*, 1994), cette souche a été nommée groupe M pour « Major ». A côté du VIH-1 groupe M, d'autres variants (O, N et P) ont été chronologiquement décrits (Fig 4).

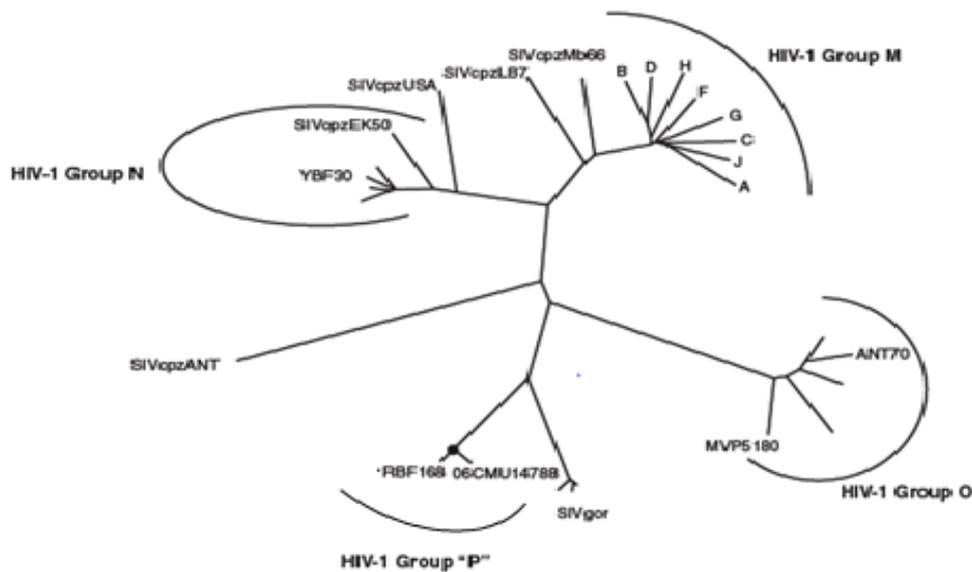


Figure 4: Diversité génétique du VIH-1, adaptée de Lihana *et al.* (Lihana *et al.*, 2012).

L'arbre phylogénétique a été construit à partir des séquences (7509 bp) des VIH-1/M (1 séquence représentative de chaque sous-type); les VIH-1/N et O sont représentés par quatre et cinq séquences respectivement; le VIH-1/P est représenté par les deux séquences des deux seuls échantillons décrits actuellement.

➤ Variant VIH-1 groupe M

Les premières tentatives de classification du VIH-1 sur la base des homologies de séquences ont été faites par une subdivision géographique (souches européennes/nord-américaines Vs. souches africaines). L'enrichissement progressif des banques de séquences a révélé les limites de cette classification ; les arbres phylogénétiques ont plutôt montré des divisions en clades équidistants les uns des autres, qui ont donné naissance à la classification alphabétique actuelle en sous-types. Ces sous-types se regroupent au sein d'un clade majeur nommé groupe M (« major ») distinct des autres groupes découverts plus tard. A l'origine de la pandémie mondiale, le VIH-1 groupe M (VIH-1/M) a représenté la majorité des isolats caractérisés soit plus de 30 millions d'infections. De nos jours, on dénombre neuf sous-types A, B, C, D, F, G, H, J et K (Robertson *et al.*, 2000) dans ce groupe, qui divergent entre eux de 15% en moyenne dans le gène gag et de 25% dans le gène env. L'amélioration des techniques de séquençage permet à présent de caractériser les souches non plus sur une seule sous-région du génome mais sur différentes régions d'un même génome voire sur le génome entier. Cette approche permet de mettre en évidence des virus mosaïques qui résultent de recombinaisons entre des virus de différents sous-types ayant infecté un même individu.

➤ Découverte des variants non-M

Après la mise en évidence du variant VIH-1 groupe M, d'autres variants au sein du type VIH-1 ont été découverts. Il s'agit des variants VIH-1: groupe O, groupe N et groupe P.

• Découverte du VIH-1/O

En 1990, une équipe de l'Institut de médecine tropicale d'Anvers a isolé un rétrovirus chez un couple camerounais résidant en Belgique et présentant des lymphadénopathies généralisées (De Leys *et al.*, 1990). Ce rétrovirus (ANT70) était morphologiquement et biologiquement semblables aux VIH-1 et VIH-2 mais avec des caractéristiques antigéniques particulières. Les analyses moléculaires ont indiqué qu'il était plus proche du VIH-1 que du VIH-2. En 1993, des analyses sérologiques ont révélé la présence des antigènes d'ANT70 dans les sérums de patients camerounais et gabonais (Nkengasong *et al.*, 1993). En 1994, des auteurs ont isolé une deuxième souche virale, MVP-5180, semblable à ANT70, chez une patiente camerounaise en stade SIDA (Gurtler *et al.*, 1994). Ce virus présentait des degrés de similarité de 56%, 65% et 83% respectivement avec le VIH-2, le VIH-1 et l'ANT70. Au courant de la même année, une autre souche, nommée VAU, a été isolée chez une patiente française en stade SIDA; la caractérisation de son enveloppe a indiqué qu'elle était proche des deux autres souches ANT70 et MVP-5180, avec toutefois des divergences au sein de ce groupe semblables à celles observées chez les autres VIH-1 (Charneau *et al.*, 1994). La différence globale entre ces trois souches était inférieure à 50%, une nouvelle nomenclature a été proposée et a subdivisé le VIH-1 en deux groupes : le groupe M pour « Major » et le groupe O pour « Outlier » (Charneau *et al.*, 1994).

L'importante diversité génétique intra-groupe est une caractéristique majeure du VIH-1 groupe O (Loussert-Ajaka *et al.*, 1995; Bibollet-Ruche *et al.*, 1998; Quinones-Mateu *et al.*, 1998; Janssens *et al.*, 1999); elle a donné lieu à plusieurs systèmes de classification. En calquant le modèle du groupe M, Roques *et al.* (2003) et Yamaguchi *et al.* (2004) ont initialement proposé un système de répartition en trois clades phylogénétiques (A, B, C) ou en cinq clusters (I, II, III, IV, V) respectivement (Charneau *et al.*, 1994; Yamaguchi *et al.*, 2004). Toutefois, Leoz *et al.* (2008), étudiant 117 séquences du gène *pol* de VIH-1/O ont montré les limites et les discordances des deux systèmes suscités (Leoz *et al.*, 2008). Un troisième modèle de classification proposé par Tebit *et al.* (2010) a été basé sur la nature du résidu en position 181 du gène de la transcriptase inverse (TI), la cystéine (C) ou la tyrosine (Y), qui définit deux lignées : 181C et 181Y (Tebit *et al.*, 2010). Néanmoins, cette classification a vite présenté des discordances puisque de nombreuses souches 181Y se sont phylogénétiquement positionnées

dans la lignée 181C. Finalement, une étude récente de la topologie de l'arbre phylogénétique des VIH-1/O a démontré que cette diversité intra-groupe résulte de la diversification des virus au cours de différentes phases évolutives (Leoz *et al.*, 2015). En effet, la topologie traditionnelle en double étoile des arbres phylogénétiques des VIH-1/M, issue d'effets fondateurs indépendants, ne se retrouve pas chez les VIH-1/O. Du fait de plusieurs phases de diversification, cette topologie prend plutôt un aspect en comète, dont la tête (*head*) rassemble les souches « H », représentatives des souches devenues prédominantes, et la queue (*tail*) regroupe les souches « T » représentatives des souches qui sont plus ancienne (Fig. 5)

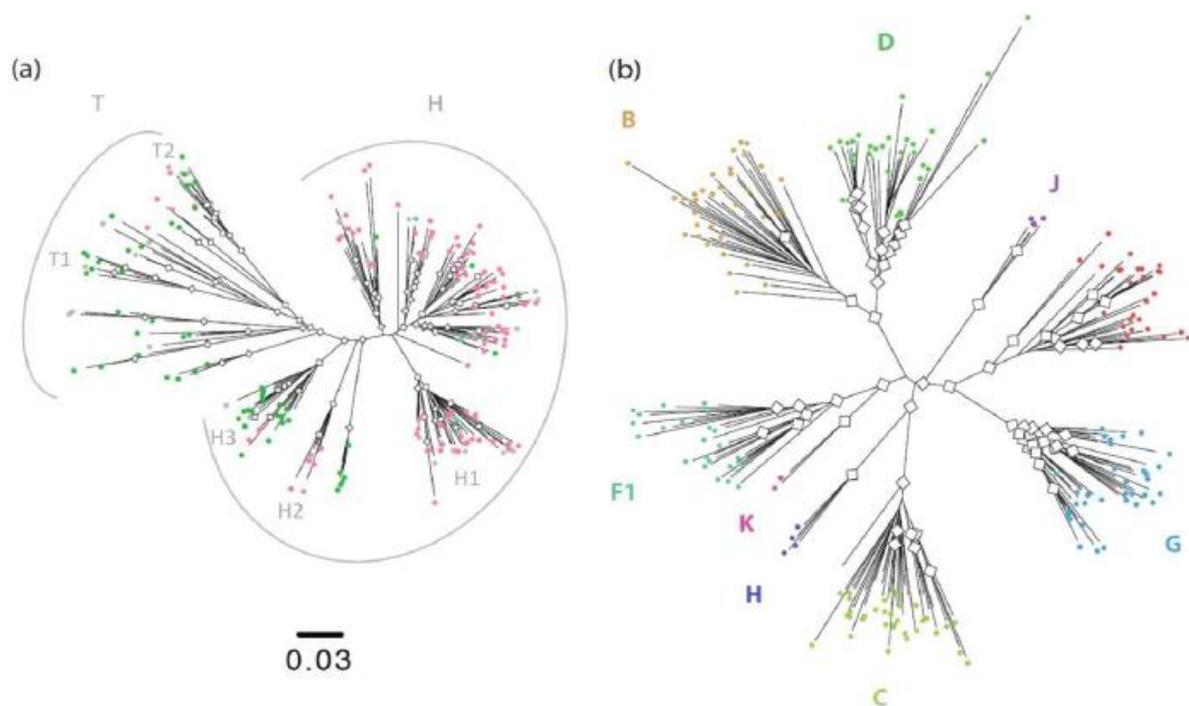


Figure 5 : Arbres phylogénétiques comparatifs des séquences de VIH-1/O (a) en forme de comète, (b) et en double étoile M.

190 séquences concaténées pour chaque groupe **O** en (a) et **M** en (b) ont été analysées par la méthode du maximum de vraisemblance ; les losanges blancs représentent des valeurs de bootstrap supérieures à 70. Les lettres indiquent la nature des sous-types identifiés dans le groupe M ainsi que les 2 sous-groupes et les clusters (H1, H2, H3, T1 et T2) au sein du groupe O. D'après Leoz *et al.* (2015) (Leoz *et al.*, 2015).

Le VIH-1/O n'est retrouvé qu'au Cameroun, en Guinée Equatoriale, au Nigeria, et au Gabon (Peeters *et al.*, 1996; Vessiere *et al.*, 2010b). Au Cameroun, les études de prévalence des VIH-1 du groupe O ont révélé que ses variants y sont endémiques et représentent moins de 1% des infections à VIH-1 (Ayouba *et al.*, 2001; Vessiere *et al.*, 2010b; Villabona-Arenas *et al.*, 2015; Rodgers *et al.*, 2017). D'autres cas de VIH-1/O ont été décrits, de façon sporadique, dans

l'hémisphère Nord, en France en particulier, le plus souvent chez des patients originaires ou en relation avec le Cameroun.

- Découverte du VIH-1/N

La première souche de VIH-1 groupe N (VIH-1/N), soit YBF 30, a été décrite en par Simon *et al.* (1998) chez une patiente camerounaise résidant à Yaoundé (Simon *et al.*, 1998). Cette souche a été différenciée du VIH-1 groupe M sur la base d'une discordance au diagnostic biologique fait à cette époque. Les auteurs ont constaté une absence de réactivité sur les tests de dépistage sérologiques et moléculaires spécifiques du groupe M (Simon *et al.*, 1998). La caractérisation phylogénétique de cette souche a indiqué que sa position dans les régions Gag et Pol était équidistante de celles des VIH-1/M et du SIVcpz-gab (caractérisé chez un chimpanzé du Gabon), mais plus distante du VIH-1/O et du SIVcpz-ant (caractérisé chez un chimpanzé en captivité en Belgique, provenant de l'Ex-Zaïre) ; cependant, ses régions LTR et Env étaient plus proches du SIVcpz-gab. Ce nouveau variant a été nommé VIH-1/N (pour Non-M, Non-O ou « New »). La présence de ce virus a été confirmée en 2000 chez quatre patients camerounais, par une analyse sérologique d'une bibliothèque de plus de 6000 sérums collectés de 1997 à 1999 et analysés au Centre Pasteur du Cameroun (Ayoub *et al.*, 2000). A ce jour, environ 20 cas d'infections à VIH-1/N ont été rapportés chez des camerounais à l'exception d'un seul cas (Simon *et al.*, 1998; Roques *et al.*, 2004; Yamaguchi *et al.*, 2006b; Vallari *et al.*, 2010; Delauger *et al.*, 2011).

- Découverte du VIH-1/P

Le dernier groupe, P, du VIH-1 a été décrit par Plantier *et al.* (2009) à la suite l'observation d'une discordance séro-moléculaire chez une patiente d'origine camerounaise mais résidant en France (J.-C. Plantier *et al.*, 2009). Alors que les tests de dépistage sérologique et la quantification du génome viral par des techniques commerciales non spécifiques de groupe attestaient d'une infection par le VIH, l'amplification de cette souche par des méthodes ciblant spécifiquement les groupes M et O n'a pu être possible. La souche RBF168 n'est donc distinguée des trois groupes de VIH-1 (M, N et O) déjà décrits ; toutefois elle est apparue phylogénétiquement très proche des SIV récemment identifiés chez le gorille (SIVgor), surtout le long du génome. Ce virus a été nommé VIH-1 groupe P (VIH-1/P) (Robertson *et al.*, 2000; J.-C. Plantier *et al.*, 2009). Une autre souche, 06CMU14788, très proche du précédent variant a été isolée chez un camerounais ayant consulté à l'Hôpital Jamot de Yaoundé ; cette découverte a permis de confirmer l'existence de ce nouveau groupe (Vallari *et al.*, 2011). A ce jour, seules

ces deux souches de variants VIH-1/P ont été décrites ; elles ont toutes deux été retrouvées chez des patients camerounais (J.C. Plantier *et al.*, 2009b; Vallari *et al.*, 2011).

I.1.3.2. Diversité génétique au sein du type VIH-2

Le VIH-2, découvert après le VIH-1, est peu répandu et réputé avoir une évolution très lente dans l'organisme à cause de son faible fitness. La différence de transmissibilité et de progression de la maladie entre les 2 types de VIH a été clairement documentée (Kanki *et al.*, 1994; Marlink *et al.*, 1994). Les VIH-2 sont caractérisés par des taux très bas de transmission hétérosexuelle et de la mère à l'enfant (1% contre 30% pour VIH-1) et une longue période d'incubation avant le développement du SIDA. Ce type de VIH est plus retrouvé en Afrique de l'ouest, avec des cas sporadiques en Afrique centrale comme au Cameroun. Neuf groupes (A-I) de VIH-2 sont actuellement décrits dans le monde (Ayouba *et al.*, 2013).

I.1.3.3. Réservoirs et ancêtres du VIH

Plusieurs controverses ont été soulevées concernant l'origine du VIH. L'hypothèse d'une transmission zoonotique résultant de plusieurs événements de transmission inter-espèces, des animaux (grands singes) à l'homme, a fini par être confirmée. L'origine simienne du VIH a été mise en évidence par la similarité de l'organisation des génomes viraux (VIH/SIV), les liens phylogénétiques, la prévalence chez l'hôte naturel, la coïncidence géographique et les voies plausibles de transmission (Gao *et al.*, 1999; Hahn *et al.*, 2000).

➤ Réservoirs simiens

Les VIH-1 et les VIH-2 résulteraient de plusieurs transmissions inter-espèces des SIV à l'Homme (fig. 6). Les premières transmissions ont pu se faire par voie sanguine, lors d'activités humaines nécessitant un contact avec les singes avec des risques de blessures, telles que la chasse, la préparation de la viande, ou encore via des morsures de singes en captivité ou domestiques (Hahn *et al.*, 2000; Gurtler, 2004; Wertheim *et al.*, 2009; Sharp *et al.*, 2011; Hemelaar, 2012).

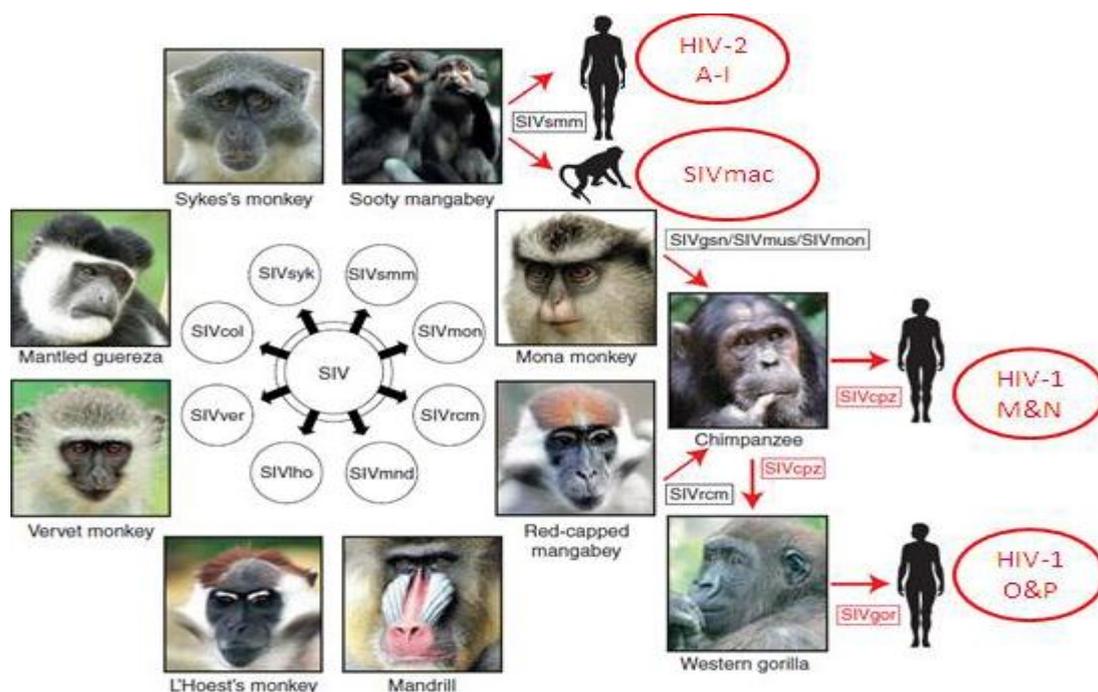


Figure 6: Origine des virus du SIDA, (Sharp *et al.*, 2011)

Les lentivirus proches du VIH, qui infectent les singes, sont appelés SIV (Simian Immunodeficiency Virus). Le nom de l'espèce de primate porteuse est indiqué par le suffixe présent dans le nom du virus, par exemple: SIVgor pour le gorille. Les transmissions inter-espèces, des singes à l'Homme qui ont donné naissance aux différents types et groupes de VIH sont représentées par des flèches rouges.

Le VIH-2 a été le premier type de VIH décrit comme résultat d'une transmission zoonotique du SIVsm. En effet, le VIH-2 et le SIVsm présentent une structure génétique identique avec un gène accessoire *vpx*; de plus, ils se retrouvent dans la même région géographique: l'Afrique de l'Ouest (Ayoub *et al.*, 2013). Un lien phylogénétique direct existe entre le VIH-2 et le SIVsm qui lui infecte les singes sooty mangabey. Ces primates sont de ce fait considérés comme réservoirs du VIH-2 (Chen *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997); les neuf groupes (A-I) connus actuellement correspondraient au moins à neuf événements de transmissions inter-espèces du SIVsm du singe à l'homme (Peeters *et al.*, 2008; Sharp *et al.*, 2011; Ayoub *et al.*, 2013). En revanche, le VIH-1 provient d'un réservoir différent, le chimpanzé; les deux virus (VIH-1 et SIVcpz) présentent une structure génétique identique contenant un gène accessoire particulier, le *vpu* (Simon *et al.*, 1994; Gao *et al.*, 1999; Cournaud *et al.*, 2003). L'épidémie à VIH-1 apparaît comme originaire de l'Afrique centrale du fait de la co-circulation des quatre groupes du VIH-1 (M, O, N et P) dans les populations humaines, de l'importante diversité des isolats VIH-1, et de la présence de chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes* infectés par des virus apparentés (Gao *et al.*, 1999; Rambaut *et al.*, 2001). Keele *et al.* (2006) ont bien montré qu'au Cameroun les chimpanzés de cette espèce seraient les réservoirs simiens des VIH-1/M et N (Keele *et al.*, 2006). Un autre virus simien a

été décrit des gorilles des plaines de l'Ouest Cameroun (*Gorilla gorilla gorilla*). Tous les nouveaux virus détectés chez ces gorilles, appelés SIVgor, ont formé un groupe lié au VIH-1/O (Van Heuverswyn *et al.*, 2006). Cependant, les relations phylogénétiques entre SIVcpz, SIVgor et VIH-1, indiquent que les chimpanzés représentent le réservoir original des SIV retrouvés chez les chimpanzés, les gorilles et l'homme (Peeters *et al.*, 2008). La découverte du VIH-1/P en 2009, virus humain le plus proche de SIVgor, a renforcé l'idée que le gorille serait un deuxième réservoir du VIH-1. Les travaux de D'Arc *et al.*(2015) sur plus de 2000 fécès de gorilles originaires de l'ouest, de l'est et des montagnes du Cameroun, ont permis d'une part d'établir la relation entre le SIVgor et les VIH-1 groupes O et P et, d'autre part, de confirmer que les gorilles des plaines de l'Ouest du Cameroun sont un réservoir simien de ces deux groupes de virus. Ces auteurs ont aussi montré que toutes les souches de SIVgor dérivent d'une seule et même lignée au sein des SIVcpz (fig. 7) (D'Arc *et al.*, 2015). Le SIVcpz serait donc passé du chimpanzé au gorille pour donner naissance au SIVgor, ensuite du gorille à l'homme pour donner naissance aux VIH-1/O et P.

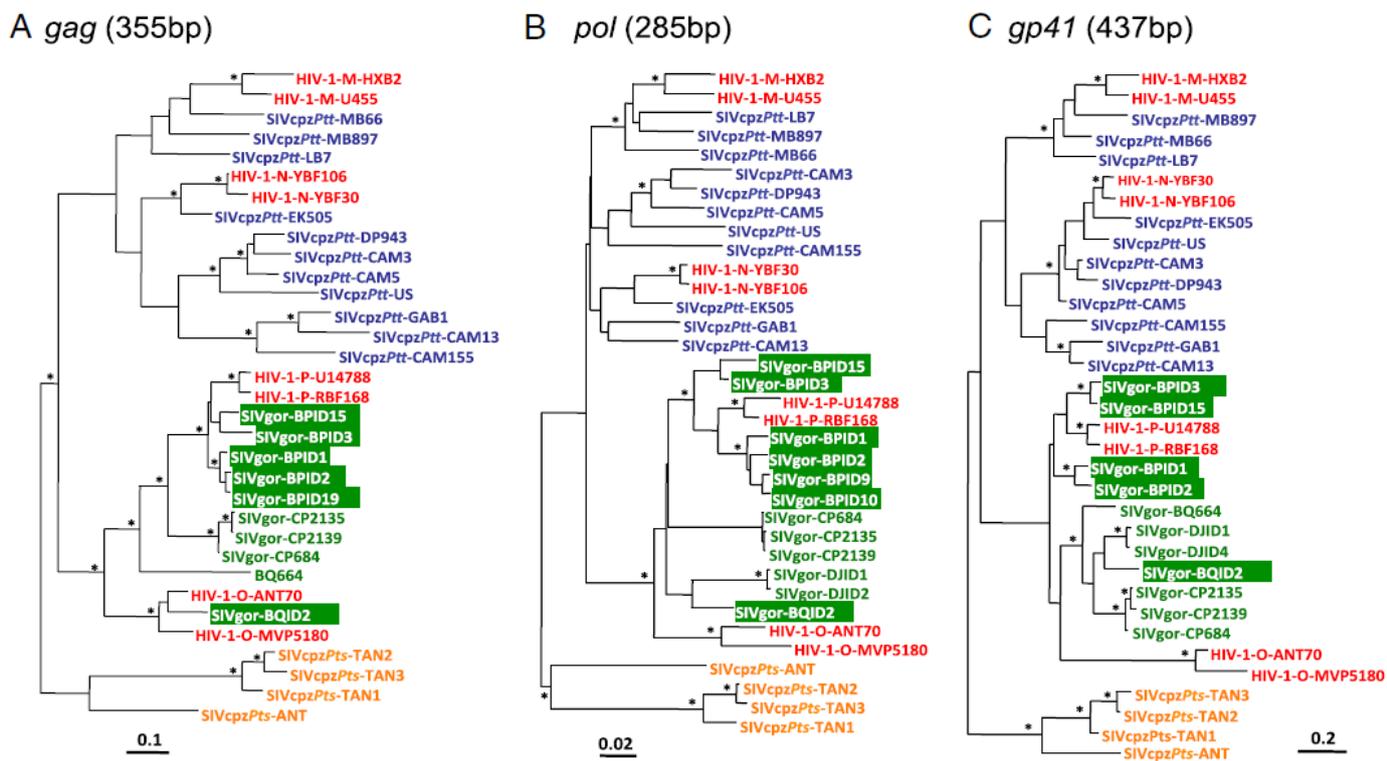


Figure 7: Relations phylogénétiques entre les lignées VIH-1, SIVcpz et SIVgor.

D'après D'Arc et al. (2015)

Les arbres phylogénétiques ont été construits à partir des séquences des gènes *gag* (A), *pol* (B) et *env* (C). La longueur des séquences (en pb) est indiquée devant le nom du gène. Les nouvelles séquences SIVgor (surlignées en vert) ont été comparées aux séquences déjà décrites : SIVgor (en vert), SIVcpzPtt (en bleu), SIVcpzPts (en orange) et VIH-1/M, N, O et P (en rouge). Les astérisques représentent les noeuds ayant une valeur de bootstrap supérieure à 70%.

➤ Datation des ancêtres des VIH actuels

Les dates de transmissions inter-espèces sont impossibles à déterminer ; toutefois, il est possible d'estimer la datation des ancêtres responsables des épidémies actuelles. Grâce à des méthodes de calcul basées sur la théorie de l'horloge moléculaire, différents auteurs ont essayé de dater les ancêtres communs les plus récents (tMRCA) des SIV et des différents types et groupes de VIH, responsables des épidémies actuelles. Ainsi, selon Wertheim et Worobey (2009), le tMRCA du SIV chez les chimpanzés (ancêtre du VIH-1) serait apparu vers 1492 (1266–1685) et celui du SIV du sooty mangabey (ancêtre du VIH-2) vers 1809 (1729–1875) (Wertheim *et al.*, 2009). Worobey *et al.* (2009) situent quant à eux le tMRCA du VIH-1/M vers 1908 (1894–1924) (Worobey *et al.*, 2008). Le tMRCA du VIH-1/O se situerait quant à lui autour de 1930 (1914–1944) (Leoz *et al.*, 2015). Les VIH-1 groupes M et O auraient donc émergé à la même période car pour Wertheim et Worobey (2009), l'ancêtre du VIH-1/N daterait des années 1963 (1948–1977) (Wertheim *et al.*, 2009) ; quant au VIH-2, ils ont estimé l'apparition du tMRCA du VIH-2 groupe A vers 1932 (1906–1955), 1905 (1857–1949) et 1942 (1921–1959) après analyse des séquences des gènes *gag*, *pol* et *env* respectivement. Dans la même analyse avec les mêmes gènes, le tMRCA du VIH-2 groupe B serait apparu en 1935 (1907–1961), 1914 (1868–1955) et 1937 (1914–1958) pour les mêmes gènes (Wertheim *et al.*, 2009). Ces résultats ont été confirmés par une large étude phylogéographique de Faria *et al.*, (2012) qui a situé la date du tMRCA du VIH-2 groupe A vers 1938 (1928–1947) (Faria *et al.*, 2012). Les VIH-2 groupes A et B seraient donc apparus à la même période et auraient été transmis des singes sooty mangabeys, de la forêt de Thaï en Côte d'Ivoire, à l'homme par deux événements indépendants (Visseaux *et al.*, 2018).

I.1.3.4. Variabilité génétique et recombinaisons

Les différents réservoirs simiens du VIH sont la première cause de la diversité génétique de ce virus ; cependant, d'autres facteurs liés au VIH lui-même contribuent de manière importante à cette diversité.

➤ Origine de la variabilité génétique du VIH liés au virus

Le génome singulier des VIH, constitué de 2 copies d'ARN non liées, facilite leur diversification virale de par sa relative plasticité. Cette diversification résulte des mécanismes conjoints de génération de mutations et de recombinaison rétrovirale. De nombreux facteurs liés à l'environnement de l'hôte mais également au virus lui-même peuvent influencer ou induire l'un ou l'autre de ces mécanismes au fil du temps.

- La faible fidélité de la transcriptase inverse

A l'origine de toute variabilité génétique, le processus de mutation est un phénomène stochastique susceptible de se manifester tout au long du génome. L'absence d'activité éditrice 3'-5' exonucléasique de la TI du VIH, associée à une intense dynamique de réplication de l'ordre de 10^{10} virions par jour (Perelson *et al.*, 1996), génère naturellement un taux de mutations élevé. Avec un taux estimé entre 1,4 et 3×10^{-5} mutations par base et par cycle, les transitions semblent 10 fois plus fréquentes que les transversions qui sont énergétiquement plus coûteuses (Mansky *et al.*, 1995; Abram *et al.*, 2010). Il en résulte la génération d'une population virale complexe chez l'individu infecté, faite de souches hétérogènes mais relativement proches sur le plan phylogénétique que l'on qualifie de « quasi-espèces » (Nowak, 1992; Wei *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 2012). De nombreux facteurs, de nature exogène ou non, peuvent changer le taux de mutations et contribuer à rendre la composition de cette population fluctuante au cours du temps (Meyerhans *et al.*, 1989). Plusieurs équipes ont en effet montré que le polymorphisme de la TI, qu'il soit naturel ou induit par un traitement antirétroviral, influence directement le taux d'erreurs introduites (Back *et al.*, 1996; Jewell *et al.*, 2003; Weiss *et al.*, 2004). Il a aussi été mis en évidence un phénomène d'hypermutation généré par des désaminases de la famille APOBEC. L'activité de la protéine APOBEC3G, sous le contrôle de la protéine virale *vif*, conduit à l'accumulation de mutations d'une cytosine en uracile (C→U) lors de la transcription inverse (Sheehy *et al.*, 2002). Ces mécanismes, associés à la pression de sélection naturelle de l'hôte, génèrent au cours du temps une importante diversité de variants, tous issus d'une même souche mais avec des dynamiques d'évolution génétique propres, perpétuelles et indépendantes.

- La recombinaison virale

L'infection d'une même cellule par deux particules virales génétiquement distinctes conduit à l'intégration des différents gènes viraux dans le génome de la cellule hôte (fig. 8).

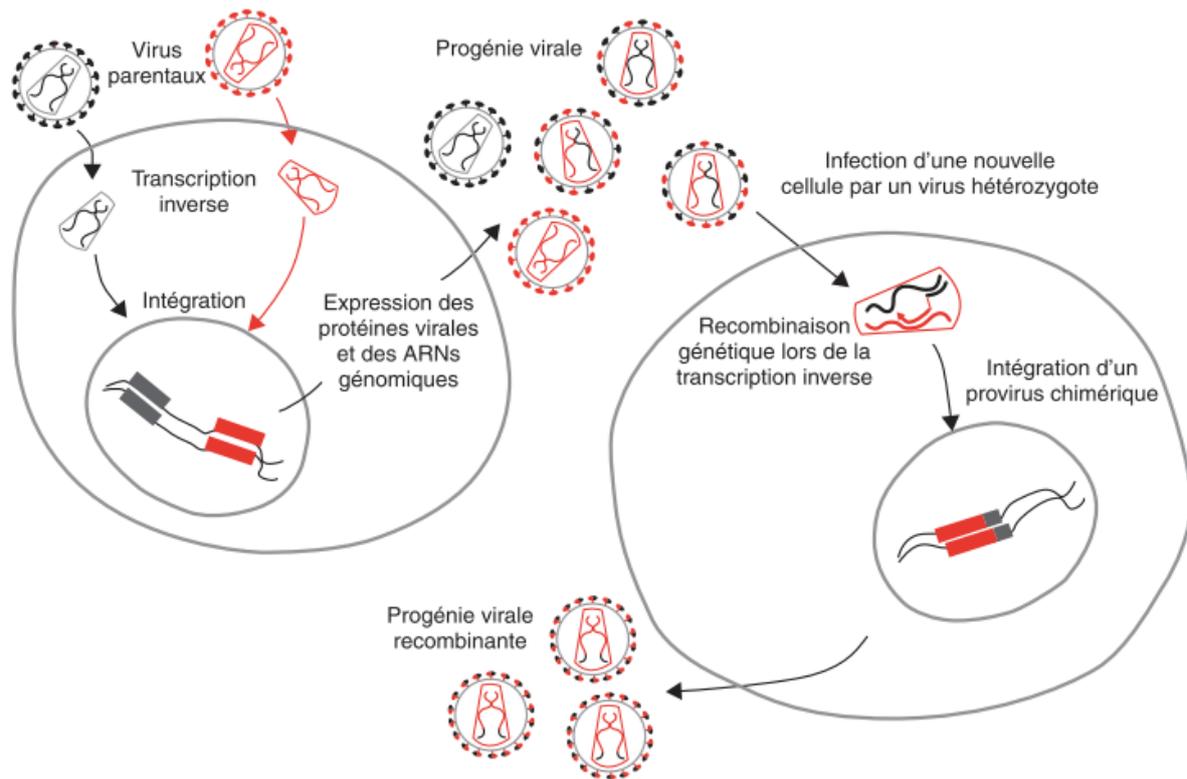


Figure 8: Processus de recombinaison d'après (E Simon-Lorière, 2006).

Des particules virales génétiquement distinctes sont présentées sous forme de virions contenant des ARN génomiques noirs ou gris (le dimère d'ARN est montré dans la capsidie virale au sein de la particule virale). La double infection mène à l'intégration de deux provirus dans le génome des cellules. La progénie virale résultante sera constituée par des virions hétérozygotes (dimère d'ARN rouge-noir) et homozygotes (dimère d'ARN rouge-rouge ou noir-noir). Chaque particule de la progénie virale est potentiellement constituée par l'assemblage de protéines issues de la synthèse de l'un ou l'autre des deux provirus. Cela est schématiquement indiqué par les capsides et les enveloppes virales partiellement noires ou grises. Après infection d'une deuxième cellule cible par un virion hétérozygote, un provirus chimérique peut être produit pendant la transcription inverse (l'exemple donné est celui de la recombinaison se produisant pendant la première synthèse de brin, par choix de copie), menant à la production des particules virales recombinantes.

La synthèse de l'ADN proviral se produit à partir des deux molécules d'ARN génomique empaquetées dans la même capsidie, l'une et l'autre pouvant servir alternativement de brin matrice lors de la transcription inverse de l'ARN en ADN complémentaire par l'effet de sauts de matrice. Ce phénomène de recombinaison peut avoir lieu entre les quasi-espèces d'un individu ou dans un contexte de co-infection ou de sur-infection, entre des virus appartenant à des sous-types, des sous-groupes ou des groupes différents. L'impact de la recombinaison sur le potentiel évolutif viral est donc lié au degré de divergence entre les souches parentales mais surtout à l'avantage sélectif procuré par la souche recombinante par rapport à son environnement (Andrews *et al.*, 2017).

En somme, ces mécanismes moléculaires ont un impact à la fois sur la production de quasi-espèces virales qui génère une diversité génétique à l'échelle individuelle du patient mais

aussi et plus largement, à l'échelle de la population infectée ; elle génère ainsi des variants (sous-types, Circulating Recombinant Form-CRF) dont l'introduction dans un environnement qui est propice à leur adaptation facilite leur émergence et leur évolution.

➤ Conséquences de la variabilité génétique

La forte variabilité du génome du VIH est à l'origine d'une évolution permanente de ce virus et de l'apparition continuelle de nouvelles souches. Le dynamisme d'évolution de ce virus exige aussi une mise à jour permanente de la classification des différents variants viraux.

Aux prémices de l'épidémie à VIH, on a distingué les entités virales « américaines » et « zairoises » sur la base de leur origine géographique (Alizon *et al.*, 1986) et de la variabilité des gènes d'enveloppe (Benn *et al.*, 1985). Au fil des caractérisations toujours plus nombreuses, permises par les avancées technologiques concomitantes et les performances croissantes des analyses phylogénétiques, un système de classification par sous-types (Myers *et al.*, 1992; Louwagie *et al.*, 1993) a été constitué au sein du groupe majoritaire, ou groupe M. Les virus les plus anciennement découverts appartiennent aux sous-types dits « purs » ; ils sont le résultat d'effets fondateurs indépendants regroupant de multiples virus aux caractéristiques virologiques différentes mais issus d'une souche unique. Les virus issus de la recombinaison entre les sous-types purs ont été classés comme des formes recombinantes uniques (Unique Recombinant Form-URF) lorsqu'ils ont été décrits chez un individu unique, ou comme des formes recombinantes circulantes (Circulating Recombinant Form-CRF) lorsqu'ils ont été issus de plusieurs patients trois ou plus sans lien épidémiologique direct (Robertson *et al.*, 2000). La classification actuelle comptabilise neuf sous-types avec cinq sous-sous-types, nommés A (A1 ; A2 ; A3), B, C, D, F (F1 ; F2), G, H, J et K, ayant chacun subi une évolution phylogénétique distincte ; certains de ces sous-types ont une prévalence plus élevée en fonction des régions géographiques concernées. La diversité génétique intra sous-type est de 15 à 20% et atteint 25 à 35% entre différents sous-types, ce qui réalise par conséquent de véritables mosaïques virales (Taylor *et al.*, 2008; Hemelaar, 2013).

Ce système de classification consensuel, fondé sur le principe de distances génétiques, fait l'objet d'une évolution permanente dont les multiples mises à jour reflètent fidèlement l'état des connaissances. Le nombre de CRF recensées à ce jour s'élève ainsi à plus de 90, dont quelques-unes sont devenues prédominantes dans certaines régions du globe ; c'est le cas des formes CRF01_AE et CRF02_AG qui circulent de manière majoritaire en Thaïlande et en Afrique de l'ouest respectivement. Le nom des CRFs porte le numéro d'ordre par lequel elles ont été décrites et une extension qui indique les différents sous-types impliqués. Par exemple,

CRF01_AE est la première forme de CRF décrite ; elle résulte de la recombinaison entre les sous-types A et E. Certaines formes recombinantes sont dites complexes parce qu'elles sont issues de la recombinaison entre trois ou plusieurs sous-types; de ce fait, elles portent l'extension « cpx » dans leur nom, par exemple CRF06_cpx qui contient des fragments des sous-types A, G, J et K. Une forme recombinante peut s'associer avec un virus d'un autre sous-type ou avec une autre forme recombinante pour donner naissance à une forme recombinante de seconde génération ou SGR pour « *Second Generation Recombinant* » ; c'est par exemple le cas de CRF15_01B qui contient des fragments de CRF01_AE et du sous-type B.

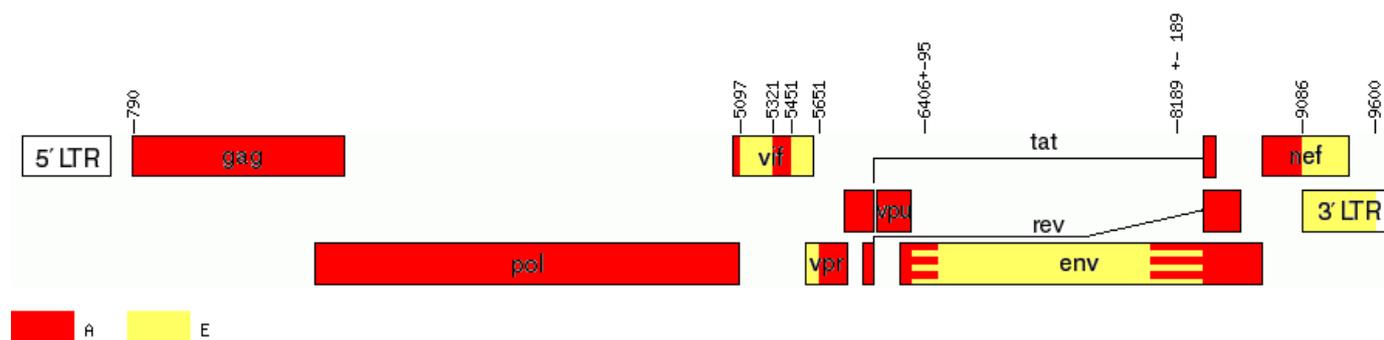


Figure 9: Génome représentant la structure mosaïque de CRF01_AE

Source: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>

La séquence du génome complet de CRF01_AE a été caractérisée pour la première fois en Thaïlande (Carr *et al.*, 1996). Les fragments dérivés des sous-types A et E sont représentés respectivement en rouge et jaune. Les positions correspondantes des différents fragments (début et fin) sont également indiquées.

I.1.3.5. Evolution de l'épidémie actuelle

De nos jours ou près de 52% de la population mondiale vit en zone urbaine ; l'épidémiologie mondiale des infections à VIH prend un nouveau visage car les villes sont des lieux majeurs de concentration des cas. Les 200 villes du monde les plus affectées ont représenté collectivement 26% des 36,7 millions [30,8 à 42,9 millions] de personnes vivant avec le VIH en 2016 avec, par ailleurs, de fortes inégalités par rapport à l'épidémie sur un même territoire (ONUSIDA, 2014b, 2017). Au Cameroun, selon l'enquête démographique de santé de 2011 (EDS 2011), la prévalence de l'infection à VIH dans la population générale adultes de 15 à 49 ans est passée de 5,5 % en 2004 à 4,3 % en 2011 ; ce qui a représenté environ 660 000 de personnes infectées (INS-Cameroun, 2012). L'épidémiologie actuelle, associée à la diversité génétique du VIH prend un nouveau schéma de diffusion globale (Wertheim *et al.*, 2014). Une méthode simple, qui utilise une approche basée sur les réseaux de communication internationaux et les séquences de polymérase du VIH des bases de données mondiales, a révélé plus de 211 liens de transmission putatifs du VIH-1 entre tous les pays du monde et, ce, malgré

l'existence d'un biais de sous-représentation des souches d'Afrique sub-saharienne (Wertheim *et al.*, 2014). Bien que partageant une origine géographique commune, la répartition actuelle des VIH-1 reste très hétérogène puisque la diffusion mondiale majoritaire du groupe M contraste avec une apparente restriction des infections à VIH-1 des groupes O, N et P au Cameroun et aux régions limitrophes.

➤ Répartition mondiale des infections à VIH-1/M

Globalement, on observe une distribution géographique spécifique des sous-types du groupe M (Fig.10). A l'échelle mondiale, le groupe M rassemble plus de 90% des souches circulantes, parmi lesquelles au moins 90% sont de sous-types non-B. Les sous-types prédominants sont le sous-type C (50 % des infections) retrouvé en Afrique du Sud, en Inde et en Chine, suivi des sous-types A (12% des infections) rencontré en Afrique de l'Est et en Europe de l'Est et du sous-type B (10% des infections) distribué en Europe de l'Ouest, en Amérique du Nord, en Australie et en Afrique du Nord, c'est-à-dire en Algérie, en Egypte et au Maroc (Buonaguro *et al.*, 2007; Lihana *et al.*, 2012). Les CRF quant à eux représentent globalement 18% des infections ; la CRF01_AE en est la forme prédominante avec environ 5% des infections dans le monde ; elle est très répandue en Asie du Sud Est (Lau *et al.*, 2013). Le CRF02_AG par contre représente 2,9% des infections à VIH dans le monde ; elle prédomine en Afrique centrale et de l'Ouest (Howard *et al.*, 1996; Olaleye *et al.*, 1996; Lau *et al.*, 2013). Dans les régions où différents sous-types circulent, on observe une émergence de CRFs qui peuvent finir par devenir majoritaires ; c'est le cas des recombinants BF en Argentine (Aulicino *et al.*, 2007).

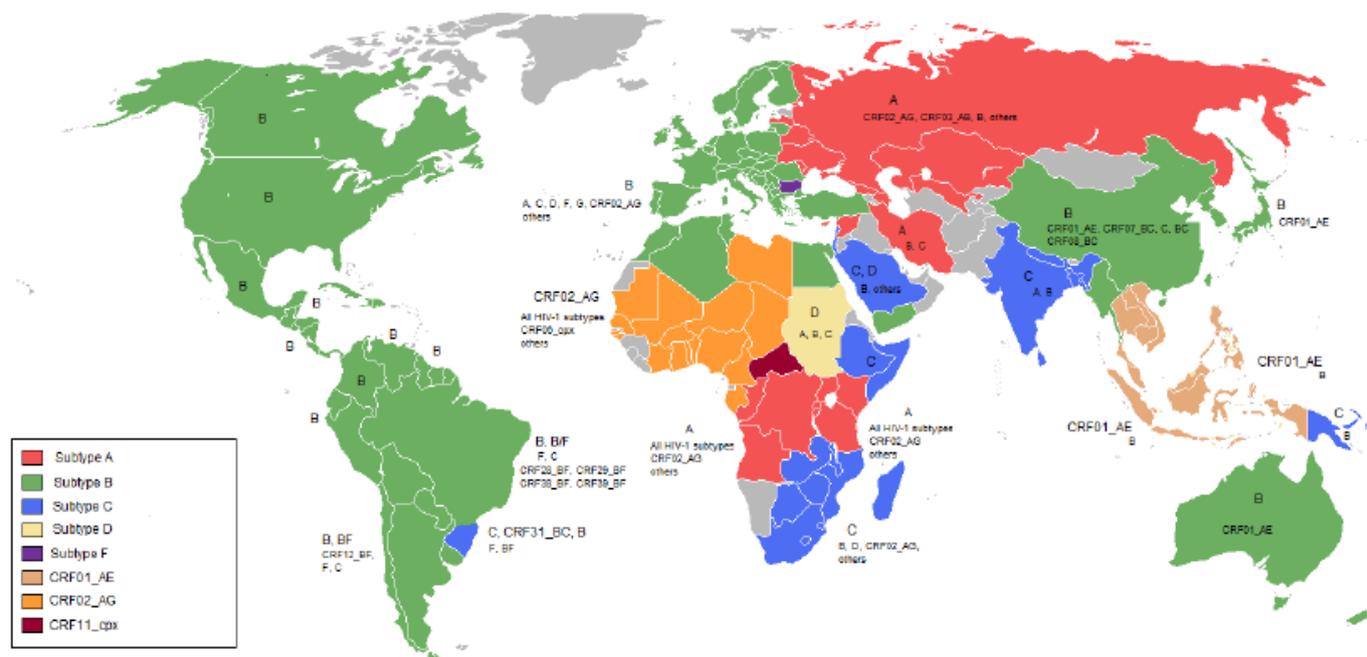


Figure 10: Répartition géographique des sous-types et CRFs du VIH-1/M, (Santos *et al.*, 2010)
 Différentes couleurs ont été utilisées pour représenter les principaux sous-types et CRFs les plus répandus, le sous-type C étant le plus prévalent (plus de 50%).

Au Cameroun, le VIH-1/M cause plus de 98% des infections à VIH, avec une circulation de plusieurs sous-types, URFs et CRFs (Brennan *et al.*, 2008; Ceccarelli *et al.*, 2012). Récemment, l'étude de Courtney *et al.* (2016), menée à Yaoundé chez des patients infectés par le VIH et naïfs de traitement ARV (TARV), a montré la présence des sous-types purs A à D et F à H avec des proportions allant de 0,6% à 4,5% (Courtney *et al.*, 2016). La circulation de ces multiples sous-types favorise la probabilité de doubles infections. Ndembi *et al.* (2011) ont identifié 8% des doubles infections par différents sous-types du VIH-1/M dans la région du Nord-Ouest (Ndembi *et al.*, 2011). Cette situation favorise la genèse et la circulation des URFs et CRFs. Ainsi, de multiples CRFs à savoir CRF01_AE, CRF02_AG, CRF09_cpx, CRF11_cpx, CRF13_cpx, CRF18_cpx, CRF22_01A1 et CRF37_cpx ont été identifiées au Cameroun avec des proportions variant de 0,2 à 65% (Courtney *et al.*, 2016). Le CRF02_AG est actuellement majoritaire et représente plus de 60% des infections à VIH au Cameroun; par conséquent, de nouveaux recombinants l'impliquant sont de plus en plus identifiés (Zhao *et al.*, 2012; Tongo *et al.*, 2013; Courtney *et al.*, 2016).

➤ Restriction géographique africaine des infections à VIH-1 non-M

Contrastant avec l'extraordinaire diffusion des VIH-1/M à toutes les régions du monde, la situation géographique des infections à VIH-1 non-M semble restrictive et liée à l'ouest de

l'Afrique centrale, en particulier au Cameroun, berceau des transmissions inter-espèces des différents groupes de VIH-1.

- Le groupe P

De nos jours, seuls deux cas de VIH-1/P ont été découverts et tous étaient originaires du Cameroun. La prévalence de ce groupe dans ce pays semble très faible puisque estimée à 0,06 % en 2011 (Vallari *et al.*, 2011). Des travaux de veille épidémiologique récents ont confirmé cette tendance par un screening diagnostique sur 13700 échantillons collectés entre 2011 et 2015, dans 22 villes et villages du Sud-Cameroun. Malgré une estimation de la prévalence à 0,015 %, du fait de deux réactivités sérologiques faisant évoquer un variant du groupe P, aucune de ces suspicions sérologiques n'a été confirmée par les tests moléculaires appropriés (Rodgers *et al.*, 2017).

- Le groupe N

Parmi les 20 souches de VIH-1 du groupe N identifiées à ce jour (Simon *et al.*, 1998; Ayouba *et al.*, 2000; Bodelle *et al.*, 2004; Yamaguchi *et al.*, 2006a; Vallari *et al.*, 2010; Pere *et al.*, 2015), seul un cas d'infection a été décrit hors du Cameroun, et plus précisément en France, chez un patient d'origine togolaise (Delaugerre *et al.*, 2011).

- Le groupe O

Les études de prévalence des VIH-1 de groupe O montrent que ces variants sont endémiques au Cameroun, où ils représentent moins de 1% des infections à VIH-1 (Ayouba *et al.*, 2001; Vessiere *et al.*, 2010b; Villabona-Arenas *et al.*, 2015; Rodgers *et al.*, 2017). Des cas sporadiques ont néanmoins été rapportés dans d'autres pays d'Afrique proches de la zone d'endémicité ; seule une diagnostiquée au Kenya fait exception (Peeters *et al.*, 1996).

Hors d'Afrique, des cas d'infection ont été décrits sporadiquement aux Etats-Unis (Gould, 1997; Sullivan *et al.*, 2000) et dans quelques pays d'Europe comme la Norvège (Froland *et al.*, 1988), la Belgique (De Leys *et al.*, 1990), l'Allemagne (Froland *et al.*, 1988; Gurtler *et al.*, 1994; Hampl *et al.*, 1995; Gould, 1997), l'Espagne et la Grande-Bretagne (Garcia-Lerma *et al.*, 1996; Mas *et al.*, 1996; Soriano *et al.*, 1996; Briz *et al.*, 2009). C'est en France que le plus grand nombre de cas a été rapporté. La surveillance épidémiologique, réalisée par le Centre National de Référence (CNR) du VIH dans le cadre de la déclaration obligatoire des nouveaux cas d'infection à VIH, a recensé 40 patients infectés par un VIH-1/O entre 2003 et 2015, soit 0,09% dont 71,4% étaient originaires du Cameroun (Barin *et al.*, 2007). La tendance épidémiologique de ces variants est à une diminution de façon non significative. Ainsi, la surveillance de la diffusion des variants non-M par le CNR a permis de recenser 135 cas de mono-infections depuis le premier cas décrit en 1992 (Agut *et al.*, 1992).

I.2. Diagnostic, traitement et suivi de l'infection à VIH

I.2.1. Histoire naturelle du VIH

L'évolution de l'infection à VIH est, pour l'heure, bien décrite pour les VIH-1/M. Il a été montré que l'efficacité de la contamination par le VIH, lors d'un événement de transmission sexuelle, sanguine ou entre la mère et l'enfant (verticale ou périnatale), est liée à la quantité de virus transmis (Garcia *et al.*, 1999; Quinn *et al.*, 2000) : plus la charge virale présente dans l'inoculum est élevée, plus l'infection a une chance d'aboutir. Le dépistage du VIH dépend du stade de l'infection. Pendant la phase précoce, la virémie plasmatique est indétectable ; on parle alors de fenêtre virologique. Une deuxième fenêtre dite sérologique correspond à la période pendant laquelle les anticorps sont indétectables dans le sang du patient.

Dans les deux premières semaines qui suivent la contamination, on observe une sélection du virus le mieux adapté à l'environnement de l'hôte (Abrahams *et al.*, 2009). La virémie est indétectable ; il n'y a pas de symptôme de l'infection, ni de manifestation immunologique mais le virus diffuse dans les tissus et organes qui seront les sites de sa future réplication. Entre 2 à 4 semaines, une fois cet entonnoir sélectif passé, la population virale infectante se multiplie abondamment et produit une charge virale plasmatique (CVp) pouvant atteindre plus d'un million de copies d'ARN/mL (fig. 11). Cliniquement, cette phase d'infection aiguë, ou primo-infection, peut se manifester par des symptômes généraux (fièvre, asthénie profonde, état grippal, diarrhées) pouvant faire évoquer un syndrome mononucléosique. La réponse immunitaire se constitue par voie humorale avec la sécrétion d'anticorps dirigés contre toutes les protéines virales, et par voie cellulaire, avec une réponse des lymphocytes T portant le marqueur CD8. L'activation de très nombreuses cellules cibles T-CD4 favorise, parallèlement à une réplication intense, l'entretien de l'infection. A quelques semaines de la primo-infection, on observe une brusque diminution de la charge virale, qui se maintient à un taux stable, et un déclin des lymphocytes T-CD4 circulants. L'individu infecté entre dans une phase de latence clinique (mais pas biologique) qui peut perdurer une dizaine d'années. Cette période reflète le fragile équilibre qui s'installe entre le maintien de la réplication virale et la réponse immunitaire cellulaire spécifique, notamment via les lymphocytes T cytotoxiques qui déclinent graduellement. Progressivement, le niveau de déplétion cellulaire est tel que le contrôle immunitaire global n'est plus maintenu et un taux de CD4 <200 cellules/mm³ de sang définit le stade SIDA. Il en résulte une ré-ascension de la CVp et l'apparition de manifestations cliniques liées à des pathogènes opportunistes qui s'achève, en l'absence de traitement, par le décès du patient.

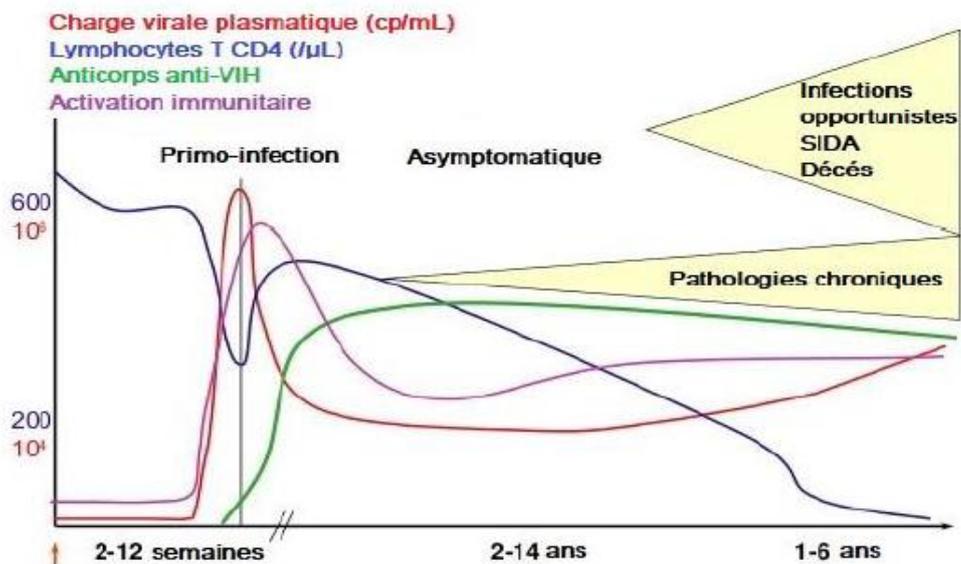


Figure 11 : Cinétique d'apparition de l'infection par le VIH-1.

Cinétique de la charge virale (ligne rouge), du taux de cellules CD4+ (ligne bleue), des anticorps anti-VIH (ligne verte) et du niveau d'activation immunitaire à partir de la contamination (flèche rouge), et manifestations cliniques associées (encadré jaune). (Maartens *et al.*, 2014)

S'agissant des VIH-1 non-M, les données d'évolution naturelle de l'infection sont éparses, d'autant qu'elles concernent un nombre restreint de patients. Ainsi, seule la patiente RBF168 reste source d'informations pour le groupe P puisque la seconde souche représentative de ce groupe, 06CMU14788, a été identifiée à partir d'un échantillon de collection (Vallari *et al.*, 2011). Par ailleurs, les résultats obtenus montrent qu'aucune manifestation clinique relative à un stade SIDA n'a été mise en évidence lors du dépistage et du suivi clinique de cette patiente (J.-C. Plantier *et al.*, 2009). Les données d'évolution naturelle de l'infection à VIH-1/N, certes peu nombreuses, font évoquer un potentiel de pathogénie au moins aussi important que celui des VIH-1/M. En effet, la plupart des cas d'infections pour lesquels des données cliniques sont disponibles montrent une majorité de patients en stade SIDA au moment du diagnostic (Simon *et al.*, 1998; Yamaguchi *et al.*, 2006a; Yamaguchi *et al.*, 2006b). C'est ce qu'illustre parfaitement le premier cas décrit, avec un tableau inaugural d'histoplasmose intestinale évoluant fatalement sept mois plus tard (Simon *et al.*, 1998). De manière semblable, les premières souches de VIH-1 du groupe O ont toutes été isolées à partir de patients, notamment des couples, en stade SIDA en l'absence de traitement antirétroviral (Charneau *et al.*, 1994; Gurtler *et al.*, 1994; Jonassen *et al.*, 1997). Les premières observations de ces cas ont montré une cinétique de décroissance de 500 CD4 mm^{-3} à 200 ou à moins de 100 CD4 mm^{-3} (Nkengasong *et al.*, 1997) et de 290 à 144 CD4 mm^{-3} (Quinones-Mateu *et al.*, 1998) sur sept ans et 19 mois de suivi respectivement. Des cas de transmission mère-enfant ont également été

rapportés (Chaix-Baudier *et al.*, 1998; Gueudin *et al.*, 2004) ; ils indiquent que les nourrissons infectés présentent d'emblée des signes cliniques liés à une immunodépression franche, avec un taux de CD4 inférieur à 400/mm³, à savoir des pneumopathies interstitielles lymphoïdes (Chaix-Baudier *et al.*, 1998) et des encéphalopathies (Gueudin *et al.*, 2004).

I.2.2. Diagnostic

Le dépistage du VIH est généralement basé sur la cinétique d'apparition des marqueurs virologiques et immunologiques de l'infection. Il dépend étroitement du stade de l'infection (fig. 12). Comme décrit plus haut en I.2.1, pendant la phase précoce, la virémie plasmatique est indétectable et on parle de fenêtre virologique. Une deuxième fenêtre, dite sérologique, correspond à la période pendant laquelle les anticorps sont indétectables dans le sang du patient.

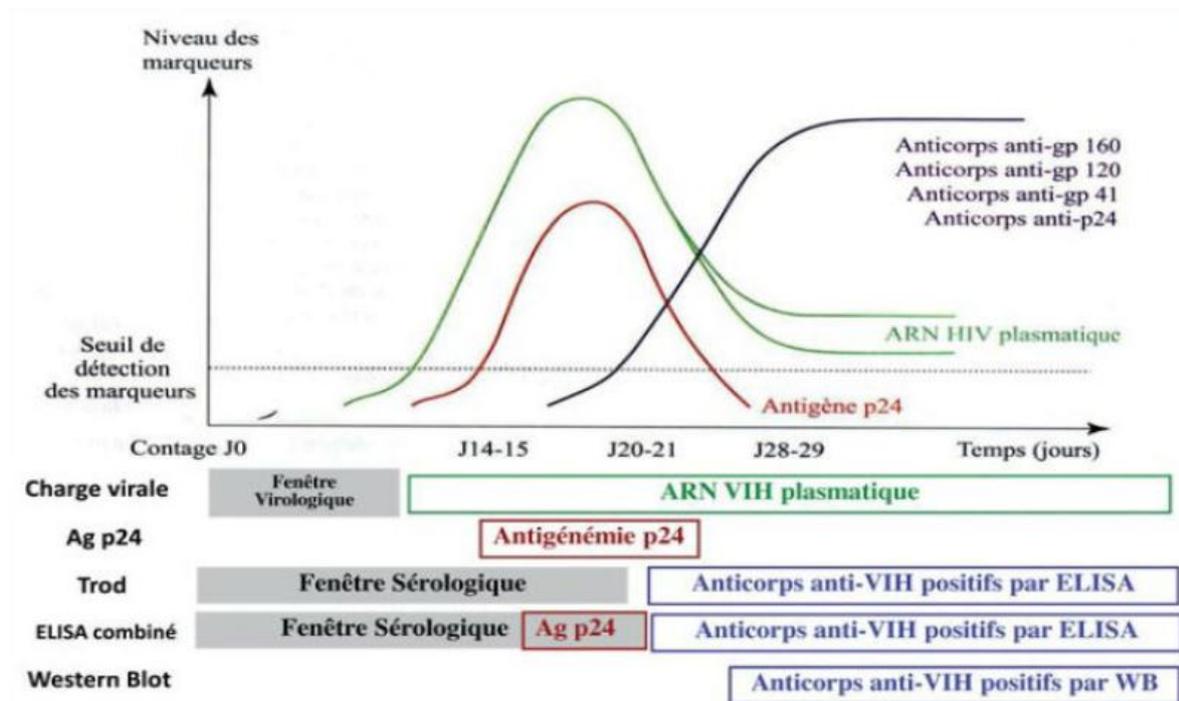


Figure 12: Evolution des marqueurs de l'infection à VIH. (D'après Délaugère et Simon 2012)

Le niveau des différents marqueurs de l'infection par le VIH varie en fonction du temps (exprimé en jours sur l'axe des abscisses). L'ARN qui est le premier marqueur (vert) est détectable dès la 2e semaine après contagion avec un pic observé vers le 20e jour; il coïncide avec le pic de l'Ag p24 (rouge). Les Ac anti-VIH (bleu) ne sont détectables qu'à partir de la 3e semaine. Les différentes méthodes utilisables en fonction du stade de l'infection sont indiquées en dessous de l'axe du temps. Les fenêtres virologique et immunologique sont également représentées.

I.2.2.1. Outils du diagnostic sérologique

Pendant la phase de primo-infection, l'absence des anticorps (Ac) conduit à la recherche de l'ARN plasmatique ou de l'antigène (Ag) p24. Le développement des tests combinés Ag-Ac ou tests sérologiques de quatrième génération, qui intègrent la détection de l'Ag p24, a permis de réduire la fenêtre sérologique de six à sept jours (Song *et al.*, 2012). Les tests de diagnostic

rapides (TDR), fortement utilisés pour le diagnostic du VIH dans les pays à ressources limitées, ne permettent que la recherche des anticorps anti-VIH à des phases plus tardives de l'infection supérieures ou égales à trois semaines. C'est pourquoi un format de quatrième génération (Determine HIV-1/2 Ag/Ac Combo) a été développé ; la sensibilité de la première version était très faible pour le diagnostic en primo-infection par rapport aux tests ELISA de la même génération (Laperche *et al.*, 2012; Brauer *et al.*, 2013).

Les techniques de diagnostic prennent de plus en plus en compte de la diversité génétique du VIH. Longtemps pris à défaut par la diversité virale, les tests sérologiques commerciaux actuels de type immuno-enzymatique ou *enzymo-immuno assay* (EIA) ont connu de nettes avancées en terme de sensibilité aux souches de VIH hautement divergentes telles que les VIH-1 non-M (Loussert-Ajaka *et al.*, 1994; Simon *et al.*, 1994; Jaffe *et al.*, 1998; Zouhair *et al.*, 2006). Alors que des échantillons de sérums des patients infectés par les souches des groupes N et P ont montré une réactivité sur de nombreux tests commerciaux (J.C. Plantier *et al.*, 2009b; Vallari *et al.*, 2010; Delaugerre *et al.*, 2011), une hétérogénéité de sensibilité analytique persiste toutefois, notamment avec les VIH-1/O du fait de la forte diversité observée au sein de ce groupe comparativement à celle des VIH-M qui se traduit sur le plan antigénique. Une étude de la sensibilité de neuf tests rapides d'orientation diagnostic ou autotests a révélé que six parmi eux présentent une sensibilité inférieure à 80% sur des échantillons de groupe O. La même observation a été faite pour d'autres tests de quatrième génération, avec une intensité de signal parfois un peu plus basse pour les échantillons de groupe O (Lemee *et al.*, 2014). L'étude de Ly *et al.* (2012), qui a comparé les sensibilités de 10 tests sérologiques commerciaux dans la détection de la fraction antigénique p24 de divers géotypes viraux, a montré que trois et six des tests évalués étaient en défaut de sensibilité sur la p24 pour les échantillons de VIH-1/O et P respectivement (Ly *et al.*, 2012). Ce problème est beaucoup plus crucial dans les pays à ressources limités, où le diagnostic repose sur l'utilisation massive des TDR car certains ont de mauvaises sensibilités pour ces variants (Gautheret-Dejean *et al.*, 2008; Aghokeng *et al.*, 2009; J.C. Plantier *et al.*, 2009a).

La technique sérologique de référence, de confirmation du dépistage, est le Western Blot, qui permet de mettre en évidence les différents anticorps anti-VIH et d'estimer la phase de l'infection. Cependant, parallèlement au problème de diversité des VIH-1/O, les profils de réactivités des anticorps obtenus par le test de confirmation Western-Blot sont très différents en fonction des variants cependant non discriminants: les réactivités complètes des VIH-1 de groupe N comme de groupe P n'offrent pas de distinction particulière par rapport au profil observé pour les virus de groupe M. Les virus du groupe O semblent présenter une faible

réactivité pour les glycoprotéines d'enveloppe, surtout de gp120 et de gp41 (Soriano *et al.*, 1996; Mourez *et al.*, 2013) (Fig.13).

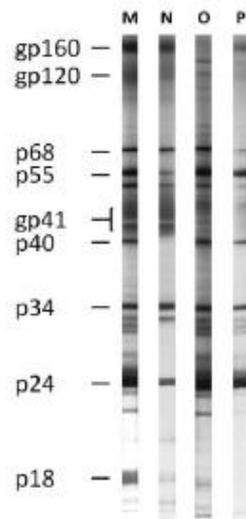


Figure 13 : Profil comparatif des réactivités des différents groupes de VIH-1 au Western-Blot. (Mourez *et al.*, 2013)

Sérums de patients infectés par un VIH-1 de groupe M, O et P obtenus hors primo-infection, et N en stade SIDA (profil incomplet du fait de la perte de réactivité de certains anticorps). Gp : glycoprotéine, p : protéine, le chiffre mentionné indique le poids moléculaire de la protéine en kDa.

Globalement, aucun test sérologique commercial ne permet une distinction entre les variants non-M. C'est pourquoi des outils spécifiques d'étude de la diversité virale ont été mis au point à la fin des années 1990 ; ils permettent de discriminer les VIH de type 1, 2 et certains SIV par un test sérologique unique (Barin *et al.*, 1996; Simon *et al.*, 2001). Le Centre Pasteur du Cameroun, en référence au Centre National de Recherche du VIH de France (CNR), utilise un test maison de sérotypage (Sérotypie) de type immuno-enzymatique ; ce test est basé sur l'utilisation de peptides synthétiques représentatifs de la diversité virale des SIV et VIH, ciblant la gp41 comme peptide de détection et la boucle V3 de la gp120 comme peptide de discrimination/différenciation utilisé pour la discrimination des groupes de VIH-1 (Simon *et al.*, 1998; Kfutwah *et al.*, 2013b). Ce test EIA spécifique de type et de groupes présente l'avantage d'être modulable selon la réactivité virale recherchée et permet un screening rapide et large des variants. Cependant, c'est une technique non commerciale mais disponible dans les laboratoires spécialisés ou les centres de référence. Les résultats de sérotypage donnent une orientation diagnostique mais seuls les outils moléculaires permettent de donner un résultat formel de génotypage.

I.2.2.2. Outils du diagnostic moléculaire

L'essor des techniques de biologie moléculaire à la fin des années 1990 a permis de grandes avancées technologiques dans le diagnostic et le suivi des infections à VIH. Ainsi plusieurs stratégies de quantification ont généré le développement de nombreuses trousse commerciales. Parmi celles-ci on peut citer la PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR), l'amplification par ADN branché (branched DNA, bDNA), l'amplification des acides nucléiques en temps réel (Nucleic Acid Sequence Based Amplification, NASBA) et l'amplification médiée par la transcription (Transcription Mediated Amplification, TMA). Le défi de la diversité du VIH a montré les limites des premières techniques commerciales du début des années 2000 car seule la trousse LCX HIV-1 RNA quantitative assay (Abbott®) permettait de quantifier de façon fiable les VIH-1/O (Swanson *et al.*, 2000; Plantier *et al.*, 2003). Dans un souci constant d'amélioration, les firmes industrielles ont fait évoluer leurs trousse pour mettre sur le marché des outils qui intègrent la détection et la quantification de VIH-1 non-M, comme en témoignent les trousse les plus récentes : Cobas ampliprep/Taqman HIV-1 V2 (Roche®) et Cobas HIV-1 pour système 4800 Roche®, Xpert HIV-1 viral load (Cepheid®) qui quantifient les virus des groupes O, N et P en plus des divers sous-types du VIH-1/M (Gueudin *et al.*, 2016).

Le problème de diversité génétique des VIH est une réalité ; il est donc nécessaire que toute discordance séro-moléculaire dans l'algorithme de prise en charge des infections à VIH suscite une recherche approfondie d'un variant divergent par des techniques appropriées. La démarche inverse de quantification spécifique des variants divergents a permis la mise au point d'outils dédiés au suivi des infections à VIH-1 du groupe O. Ainsi la première RT-PCR quantitative, élaborée par le laboratoire de virologie de Rouen associé au CNR du VIH, a ciblé la région conservée des LTR (Gueudin *et al.*, 2003). Cet outil a été abandonné du fait de son manque de sensibilité (limite de quantification à 200 cp/mL) ; une seconde RT-PCR ciblant la région de l'intégrase a montré des performances bien supérieures avec une spécificité élevée et un seuil de quantification de 40 cp/mL (Gueudin *et al.*, 2012). Ces outils ne sont toutefois pas accessibles en routine diagnostique et restent l'apanage de centres spécialisés.

Pour le diagnostic, il est aussi possible de détecter l'ADN proviral intégré dans les cellules lorsque la charge virale plasmatique est indétectable. Cette méthode est utilisée notamment pour le diagnostic précoce de l'infection à VIH chez les nourrissons nés de mères séropositives, chez qui les tests sérologiques ne sont pas informatifs en raison de la présence des anticorps maternels (Gueudin *et al.*, 2004; Tejiokem *et al.*, 2011). La recherche de l'ADN proviral pour le diagnostic précoce de la transmission mère-enfant et le diagnostic chez les

enfants VIH-1/O positifs, en particulier sous traitement antirétroviraux, est uniquement possible avec une technique non commerciale (Gueudin *et al.*, 2004).

I.2.3. Suivi

Depuis la découverte du VIH, des progrès ont été obtenus sur les outils de diagnostic (on est passé des outils sérologiques aux outils moléculaires) et concernant le suivi virologique des patients. A l'origine, le suivi virologique a été essentiellement axé sur la mesure du taux de CD4 ; par la suite, la Charge virale (CV) est devenue l'outil de référence pour le suivi des patients. Depuis quelques années, avec l'émergence des échecs de traitements des patients dus à la résistance du virus VIH aux ARVs, un test de résistance aux antirétroviraux est aussi entré dans le panel des outils utilisés pour le suivi patients de palier.

I.2.3.1. Numération des cellules porteuses du récepteur CD4

Dès 1984, le rôle majeur joué par les cellules, qui expriment à leur surface la molécule CD4, dans la pathogenèse du SIDA a été démontré. Cette molécule constitue, avec les récepteurs des chimiokines, la principale porte d'entrée du virus dans les lymphocytes T CD4+ et les monocytes/macrophages (M, 1997). Les lymphocytes T CD4+ représentent la principale cible cellulaire du VIH ; la détermination précise et exacte de leur nombre est nécessaire pour évaluer le degré de déficit immunitaire des sujets infectés par le VIH. Le nombre des lymphocytes CD4+ est, avec la charge virale, un élément fondamental et indépendant dans la décision de débiter un traitement antirétroviral chez des sujets asymptomatiques (Mellors *et al.*, 1997). Il permet également d'évaluer l'efficacité de ces traitements, dont l'objectif à moyen terme est de contrôler la réplication virale et de restaurer le système immunitaire (Autran *et al.*, 1997). Le nombre des lymphocytes CD4+ permet de prédire la survenue des infections opportunistes au cours de l'infection par le VIH et de définir le moment opportun pour débiter une chimioprophylaxie contre ces infections opportunistes (Fahey *et al.*, 1990). La mesure du taux de lymphocytes T-CD4 comme paramètre de mise sous traitement et de suivi des patients infectés par le VIH_ a donc rapidement été mise sur pieds et la technique de cytométrie en flux reste la méthode conventionnelle ; d'immunophénotypage des taux des lymphocytes CD4 (comptage de ces cellules). Cependant, de nombreux facteurs intrinsèques de variabilité tant sur le plan analytique que biologique conditionnent la précision du résultat ils rendent du même coup la technique de cytométrie en flux très complexe (Fei *et al.*, 1993).

I.2.3.2. Charge virale

La détermination de la charge virale plasmatique (CVp) est possible dès la 2^{ème} semaine post contamination. Cette technique n'est pas recommandée pour le diagnostic. Utilisée pour le suivi virologique des patients séropositifs, elle permet toutefois d'estimer le niveau de réplication du virus et trouve particulièrement son utilité pour déterminer le succès ou l'échec d'une thérapie antirétrovirale. Le suivi est réalisé par la mesure de l'ARN viral dans le plasma, qui témoigne d'une réplication virale dans l'organisme. Le niveau initial est variable selon les sujets; c'est l'un des déterminants du risque de progression vers un déficit immunitaire. Au moment d'une primo-infection, le taux d'ARN VIH plasmatique est généralement élevé (5 à 7 log₁₀ copies/mL). D'après les recommandations de OMS, chez un patient mis sous traitement, la CVp doit devenir indétectable (<50 copies/mL) après environ 6 mois de traitement aux ARVs ; c'est un bon indicateur d'un succès thérapeutique (WHO, 2013). Il existe plusieurs techniques automatisées de quantification de la CVp. Plusieurs trousse de mesure de la CVp spécifique du VIH-1/M sont commercialisées : NucliSENS EasyQ® HIV-1 v2.0 (Biomerieux) et Artus® HI Virus-1 RG RT-PCR Kit (Qiagen). Une technique développée par l'ANRS, appelée Generic HIV charge viral, est maintenant commercialisée (Biocentric) et largement utilisée dans les pays à ressources limitées (Rouet *et al.*, 2007). D'autres trousse qui quantifient de façon non spécifique les VIH-1/M et O sont également disponibles, par exemple RealTime HIV-1 (Abbott Molecular), Cobas Taqman HIV-1 v2.0 (Roche Molecular Diagnostics) et le Xpert® HIV-1 Viral Load (Cepheid). Le choix d'une trousse doit tenir compte de la diversité génétique du VIH dans la région.

I.2.4. Traitement

Au total et à présent, 27 molécules antirétrovirales sont indiquées dans le traitement de l'infection à VIH de l'adulte. Elles sont regroupées en cinq classes thérapeutiques qui ciblent, chacune, une étape du cycle de réplication du virus. L'objectif premier du traitement ARV est d'empêcher la réplication du virus, en rendant la CVp indétectable, c'est-à-dire inférieure à 50 copies/mL, tout en maintenant ou restaurant un nombre de CD4 au-dessus de 500/mm³. Secondairement, le traitement doit rechercher la meilleure tolérance possible, l'amélioration ou la préservation de la qualité de vie et la réduction du risque de transmission (Philippe, 2018). Dans l'optique d'atteindre les objectifs 90%/90%/90% fixés par l'ONUSIDA, les nouvelles recommandations de l'OMS sur le traitement sont passées de l'administration du traitement par les ARVs à partir d'un taux de CD4<500 cellules /mm³ de sang au « *test and start* », c'est-à-dire traiter tous les patients déclarés VIH positifs (WHO, 2015).

I.2.4.1. Types d'antirétroviraux

En fonction de l'étape du cycle de réplication virale ciblée, on distingue quatre grandes classes d'antirétroviraux appelés inhibiteurs d'entrée, de la transcriptase inverse, d'intégrase et de la protéase.

➤ Les inhibiteurs d'entrée (IE)

Ces molécules agissent précocement à trois niveaux de l'étape de pénétration du virus dans la cellule hôte, c'est-à-dire par inhibition de la phase d'attachement, par antagonisme des corécepteurs cellulaires CCR5, enfin par blocage de l'étape de fusion de l'enveloppe virale et de la membrane cellulaire. Seules des molécules qui agissent sur les deux dernières étapes sont actuellement commercialisées.

Les antagonistes des corécepteurs CCR5 sont des inhibiteurs allostériques ; ils sont utilisés en association avec d'autres molécules antirétrovirales pour le traitement des infections à virus de tropisme R5. Le seul représentant de cette classe thérapeutique actuellement commercialisé est le maraviroc (MVC, CELSENTRI). D'autres molécules ayant le même mécanisme d'action, telles le vicriviroc et le cenicriviroc, sont actuellement en cours d'étude (Phase I dans des combinaisons microbicides et phase III respectivement). Uniquement active sur les virus de tropisme R5, cette sous-classe thérapeutique nécessite en amont une détermination du tropisme viral. A ce jour, deux modèles de préférences coexistent (Rose *et al.*, 2009).

Le principal écueil de ces outils de traitement réside dans leur mise au point exclusivement faite par des séquences de VIH-1/M de sous-type B (prédominant dans les pays occidentaux). L'enfuvirtide (T20, FUZEON) est le seul inhibiteur de fusion actuellement commercialisé. Combiné à d'autres agents antirétroviraux, il est indiqué en administration sous-cutanée, comme thérapie de sauvetage chez les patients infectés par un VIH-1 en échec virologique d'un traitement précédent. Il correspond à un court peptide de 36 acides aminés qui mime le domaine extracellulaire HR2 de la gp41 (De Clercq, 2002). Il agit en bloquant le changement de conformation de la gp41 et en empêchant la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane cellulaire.

➤ Les inhibiteurs de transcriptase inverse (ITI)

La TI a été la première cible virale des thérapeutiques antirétrovirales. Il existe deux classes pharmacologiques distinctes qui inhibent cette enzyme-clé du cycle de réplication virale : les inhibiteurs nucléos(t)idiques et non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI et INNTI respectivement).

Les INTI sont des analogues de nucléosides naturels dépourvus du groupement hydroxyl en 3'. Ils subissent une phosphorylation par des kinases cellulaires pour devenir pleinement actifs. L'incorporation en 3', par la TI, d'un INTI au lieu d'un nucléotide naturel bloque la phase d'élongation de l'ADN, du fait de la modification de la terminaison du groupement nécessaire à l'établissement d'une liaison phosphodiester dans la chaîne d'acides nucléiques. Les INTI agissent donc comme des terminateurs de chaîne. Historiquement, le composant 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine, nommé aussi zidovudine (AZT, RETROVIR), a été le premier à montrer un bénéfice clinique sur les patients infectés dès 1987 (Yarchoan *et al.*, 1987). Depuis lors, bien d'autres molécules ont enrichi cette classe socle de la trithérapie d'initiation conventionnelle. A côté des molécules les moins prescrites (Stavudine d4T, ZERIT ; Didanosine ddI, VIDEX), on peut citer la Lamivudine (3TC, EPIVIR), l'Emtricitabine (FTC, EMTRIVA), l'Abacavir (ABC, ZIAGEN), le Ténofovir disoproxil fumarate (TDF, VIREAD).

Les INNTI sont, quant à eux, des inhibiteurs allostériques directs de la TI. En se liant à un site précis de la poche hydrophobe de l'enzyme, ils inhibent la polymérisation de l'ADN néoformé. On distingue actuellement quatre molécules : la Névirapine (NVP, VIRAMUNE), l'Efavirenz (EFV, SUSTIVA), l'Etravirine (ETV, INTELENCE) et la Rilpivirine (RPV, EDURANT).

➤ Les inhibiteurs d'intégrase (INI)

Les diketo-acides de cette récente classe d'antirétroviraux des inhibiteurs d'intégrase agissent comme inhibiteurs catalytiques, en chélatant les ions divalents du core catalytique. A ce titre, ils bloquent spécifiquement l'étape de transfert de brin et méritent plus justement l'appellation d'inhibiteurs de transfert de brin (Espeseth *et al.*, 2000; McColl *et al.*, 2010). Depuis la commercialisation en fin 2007, du Raltegravir (RAL, ISENTRESS), première molécule de cette classe, deux autres molécules ont été autorisées sur le marché: l'Elvitegravir (EVG, en France, uniquement) et la Dolutegravir (DTG, TIVICAY). Le Bictegravir et le Cabotegravir sont des molécules de cette même classe, actuellement en cours d'essai clinique mais déjà prometteuses (Margolis *et al.*, 2015; Jones *et al.*, 2017; Sax *et al.*, 2017).

➤ Les inhibiteurs de protéase (IP)

Les IP agissent par inhibition compétitive en se liant directement par un groupement hydroxyl au carboxyl du site actif de l'enzyme. Malgré l'important polymorphisme de cette enzyme, le site de liaison de ces molécules inhibitrices semble relativement conservé. La profusion de développements industriels des IP a été permise par une évolution des squelettes protéiques déjà existants ; ce qui a donné naissance à 10 molécules dans la classe des inhibiteurs de protéase à savoir: l'Amprénavir (APV, AGENERASE), l'Indinavir (IDV, CRIXIVAN), le

Nelfinavir (NFV, VIRACEPT), le Saquinavir (SQV, FORTASE/INVIRASE), le Tipranavir (TPV, APTIVUS), le Ritonavir (RTV, NORVIR), le Lopinavir (LPV en association fixe avec le Ritonavir dans la spécialité KALETRA), le Fosamprenavir (FPV, TELZIR) comme prodrogue de l'Amprenavir, l'Atazanavir (ATV, REYATAZ), et le Darunavir (DRV, PREZISTA) ; seules les cinq dernières molécules font partie des schémas de recommandations thérapeutiques actuels. Le ritonavir exerce une importante inhibition de l'isoenzyme 3A4 du cytochrome P45 ; il permet ainsi de diminuer le métabolisme des autres molécules. A ce titre, des concentrations subthérapeutiques de ritonavir sont communément co-administrées avec les inhibiteurs de protéase (Margolis *et al.*, 2015). Parmi les molécules les plus récentes, le Darunavir possède une très forte affinité de l'ordre de cinq fois supérieure aux agents plus anciens pour l'enzyme protéase et ce, même sur un substrat déjà résistant aux molécules les plus anciennes (King *et al.*, 2012).

➤ Antirétroviraux en cours de développement

- Les inhibiteurs d'attachement

Contrairement aux autres inhibiteurs d'entrée, le Fostemsavir (GSK-3684934), initialement BMS-663068 (prodrogue du BMS-626529), agit en se liant directement à un site conservé de la gp120. Il empêche alors toute liaison au récepteur CD4 de la cellule hôte. Une première étude clinique a prouvé son efficacité virologique, *in vivo*, dans un essai de monothérapie de huit jours chez des patients infectés (Nettles *et al.*, 2012). Une seconde analyse, à plus large échelle, a montré son équivalence en comparaison avec l'Atazanavir boosté au Ritonavir (Lalezari *et al.*, 2015). Les étapes de développement se poursuivent actuellement par des études de phase III sur des patients lourdement prétraités (étude BRIGHT NCT02362503).

- Les inhibiteurs de capsid

Des composés ciblant la capsid du VIH ont montré une inhibition de la réplication du cycle viral de souches de laboratoires mais aussi d'isolats cliniques. Parmi les molécules issues de screening de bases de données chimiques ou de la sélection par cartographie en cristallographie à rayons X, il y a actuellement en cours d'étude la CAP-1 (Kelly *et al.*, 2007), les dérivés de benzodiazépines et de benzimidazolés (Lemke *et al.*, 2012), le CK026 et les dérivés (Lemke *et al.*, 2012), PF74 (Shi *et al.*, 2011), le BI-1 et le BI-2 (Lamorte *et al.*, 2013; Fricke *et al.*, 2014).

- Les inhibiteurs de maturation

Dérivés betulinés d' α -kéto amides, ces composés empêchent le clivage protéolytique exercé par la protéase virale, lorsqu'ils se lient à la protéine précurseur polyprotéique Gag au

cours des étapes tardives de maturation. Le Bevirimat a été le chef de file de cette classe thérapeutique mais son développement a été stoppé en 2010, pour favoriser des dérivés ayant une meilleure efficacité sur l'ensemble des quasi-espèces virales. En effet, le polymorphisme naturel de certains virus réduisait de façon significative leur sensibilité au Bevirimat (Van Baelen *et al.*, 2009; Margot *et al.*, 2010). A ce titre, les données phénotypiques récentes des composés GSK8999 et BMS-955176 semblent prometteuses pour la poursuite du développement de cette classe thérapeutique (Nowicka-Sans *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2017).

- Les inhibiteurs allostériques de l'intégrase ou ALLINIs

Cette classe pharmacologique agit sur l'étape de maturation du virus en inhibant le facteur de croissance cellulaire LEDGF/p75 ou *Lens Epithelium-Derived Growth Factor*. Cette protéine est un cofacteur cellulaire qui se lie à l'intégrase pour favoriser l'attachement à l'ADN viral (Van Maele *et al.*, 2006; Hombrouck *et al.*, 2007). L'ensemble crée ensuite un complexe d'attachement à la chromatine humaine (Poeschla, 2008). Une poche de liaison au domaine catalytique de l'intégrase a été identifiée comme cible de l'action antivirale des ALLINIs (Christ *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2016). Plusieurs molécules ont déjà été étudiées dans des phases de développement très précoce et semblent intéressantes (Zhang *et al.*, 2017).

D'autres stratégies font l'objet de recherches intensives pour traiter l'infection à VIH, dans un modèle d'éradication permanente de l'infection. Ces thérapies, essentiellement basées sur le modèle du « *Shock and Kill* », cherchent à induire la réactivation virale à partir des réservoirs viraux d'ADN proviral pour « purger » la production virale par cytolysse ou inactivation immunologique.

I.2.4.2. Combinaison des ARVs

Afin de rendre plus efficaces les stratégies de traitement, les protocoles ont été standardisés en fonction des molécules et des combinaisons possibles entre ces dernières, en prenant bien-sûr en compte les phénomènes d'inhibitions et de toxicité de certains de ces composés. Les stratégies de traitement ont donc évolué des monothérapies recommandées les années antérieures aux trithérapies actuelles qui ont très bien démontré leur efficacité.

Dans les pays développés où la prise en charge est très dynamique et les molécules sont pour la plupart disponibles, plusieurs combinaisons sont préconisées. Des inhibiteurs nucléotidiques sont en co-formulation sous forme de bithérapie, notamment le KIVEXA (co-formulation d'ABC+3TC) et le TRUVADA (FTC co-formulé avec TDF). Ces molécules sont pour la plupart associées à un INNTI pour le traitement d'un patient. C'est l'exemple de l'ATRIPLA (association FTC+TDF avec EFV), et de l'EVIPLERA (co-formulation

TDF+FTC+RPV) pour ne citer que ceux-là. Il existe aussi des associations entre les INTI et les IP ; c'est le cas de l'association fixe de DRV+FTC+TDF (SYMTUZA). Malgré leur inaccessibilité actuelle dans la plupart des pays à ressources limitées, les recommandations de traitement les plus récentes intègrent toutefois les INT, en association classique de 2 INTI en trithérapie, dans les schémas thérapeutiques d'initiation chez les patients (Philippe, 2018), notamment le Dolitegravir en association avec ABC+3TC (TRIUMEQ).

A cause du coût assez élevé des molécules de traitement dans les pays à ressources limitées, une autre stratégie a été adoptée afin s'assurer un bon suivi des patients dans ces pays. L'OMS y a adopté l'utilisation uniquement de deux classes d'ARVs: les inhibiteurs nucléotidiques et non nucléotidiques de transcriptase inverse et les inhibiteurs de protéases ; il s'agit de 2INTI +1INNTI en première ligne et de 2INTI+1IP en deuxième ligne de traitement (Organization, 2010). Cette mesure a entraîné une remarquable augmentation du nombre de personnes sous traitement aux ARVs dans ces pays, c'est-à-dire 15,9 millions de personnes à la fin de 2015 (WHO, 2015) contre seulement 300 000 personnes mises sous ARV en 2002 (Hirnschall *et al.*, 2013).

Au Cameroun, les recommandations de traitement de l'OMS en 2010 ont été mises en application en 2011. En première ligne on a utilisé la combinaison : 3TC+d4T soit AZT+ EFV ou NVP ; en deuxième ligne de traitement on a associé le 3TC + AZT ou 3TC+TDF à la LPV, ou enfin à la ATV (MINSANTE, 2014). Cependant, compte tenu de la forte représentativité des sous-types VIH-1/M non B au Cameroun en particulier et dans les pays à ressources limitées en général, l'OMS y a placé en 2013 le TDF comme molécule préférentielle dans les protocoles de première et deuxième lignes de traitement (Bender *et al.*, 2010; WHO, 2013). Cette molécule est reconnue comme ayant une faible toxicité et une forte tolérance chez les patients mais aussi elle représente une bonne barrière génétique contre le virus. Cette recommandation a été implémentée au Cameroun depuis 2014 (MINSANTE, 2014) où le protocole de traitement est donc constitué actuellement :

- En première ligne :

Du protocole préférentiel : Ténofovir + Lamivudine/Emtricitabine + Efavirenz,

Des protocoles alternatifs :

- Zidovudine + Lamivudine+ Efavirenz ou Névirapine,
- Ténofovir + Lamivudine + Névirapine ;

- En deuxième ligne :

Du protocole de préférence : Ténofovir + Lamivudine + Lopinavir/r ou Atazanavir/r,

Des protocoles alternatifs :

- Zidovudine + Lamivudine + Lopinavir/r ou Atazanavir/r,
- Abacavir + Didanosine + Lopinavir/r.

Les protocoles de troisième ligne de traitement sont déjà aussi implémentés dans ces pays, bien qu'ils soient très rares du fait de leur coût. Ils sont néanmoins constitués de deux INTI associés au Raltegravir/Dolutegravir+Darunavir/r ou deux INTI+Etravirine+Darunavir/r.

La mesure de la charge virale est indispensable pour évaluer l'efficacité d'un traitement ; elle permet de confirmer précocement l'échec thérapeutique. Elle doit être indétectable après six mois d'un TARV bien conduit. Toutefois, le seuil de détectabilité dépend de la méthode utilisée par chaque laboratoire. En l'absence de la charge virale, l'utilisation des critères immunologiques (mesure du taux des CD4) pour confirmer l'échec thérapeutique doit être exceptionnelle. A défaut de ces critères charge virale et taux le CD4, l'échec thérapeutique peut être défini sur une base clinique. Dans ce cas le principe consiste à changer au moins deux molécules en introduisant une nouvelle classe thérapeutique (IP-booste par le Ritonavir) ; pour cela, un test de résistance du VIH aux ARVs est nécessaire afin de choisir les bonnes molécules pour l'agent en cause (Organization, 2010; WHO, 2013).

I.3. Résistance du VIH aux ARVs

Au cours d'un bon suivi thérapeutique des patients infectés par le VIH, le taux de CD4 augmente avec le temps pour atteindre un certain plateau. La charge virale, quant à elle, diminue et devient indétectable avec le temps. Cependant chez certains patients, cette charge virale reste élevée malgré le traitement antirétroviral ; on parle alors d'échec thérapeutique. D'après l'OMS, un patient est déclaré en échec thérapeutique lorsque la CV > 3log copies/mL (1000 copies/mL), après un an de traitement bien conduit et bien observé (Organization, 2010). L'échec thérapeutique est dû, la plupart du temps, à l'adaptation du virus (apparition des mutations sur le génome viral) aux molécules administrées au patient, ce qui entraîne une résistance aux ARVs à lui administrés.

I.3.1. Concept de résistance

La résistance d'un virus aux ARVs est due à l'apparition des mutations sur le génome viral. Ces mutations sont matérialisées par un changement de nucléotide qui conduit à un changement d'acide aminé au niveau du génome viral à des positions bien précises. Ce changement nucléotidique résulte d'une incapacité de la TI à corriger ces erreurs pendant la réplication (Preston *et al.*, 1988). Il a été estimé que chez chacun génome viral, des changements

peuvent se produire entre 10^4 et 10^5 fois par jour chez un individu infecté par le VIH non-traité et que des doubles mutants surviennent fréquemment et conduisent à l'apparition des quasi-espèces (Preston *et al.*, 1988). Les quasi-espèces du VIH d'un même individu subissent une variation génétique, une compétition et une sélection en continu. Le développement de la résistance dépend de la taille et de l'hétérogénéité de la population virale au sein d'un individu, de l'importance par laquelle la réplication virale continue durant la thérapie, de la facilité d'acquisition d'une mutation particulière ou de plusieurs mutations et de l'effet des mutations conférant des résistances sur la sensibilité et la fitness virale (Preston *et al.*, 1988). Ces mutations de résistance sont générées spontanément par la diversité des quasi-espèces virales mais, du fait d'une fitness beaucoup plus délétère, il est rare que les virus mutés prédominent chez leur hôte. L'émergence de ces variants mutés est cependant rendue possible par la pression de sélection exercée par le TARV sur l'ensemble des populations virales, c'est-à-dire qu'un traitement à doses suboptimales diminue la circulation du virus sauvage sensible et permet au virus muté de profiter d'un avantage relatif dans ces conditions. L'émergence de ces variants mutés peut conduire à des résistances qui entraînent une réduction de la sensibilité du virus actuel aux ARVs par rapport au virus sauvage (Fig.14).

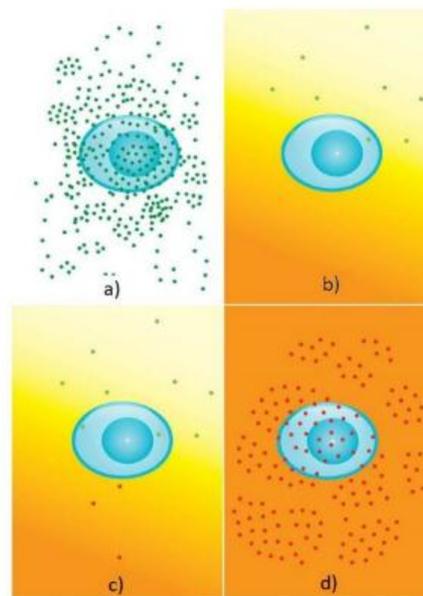


Figure 14 : Cinétique d'émergence d'un virus résistant au traitement administré (Pironti *et al.*, 2017a)

Point vert : virus répliatif sensible au traitement, Point rouge : virus répliatif résistant au traitement, Gradient jaune à orange : variation de concentrations du traitement selon les compartiments (suboptimales à pleinement optimales) a) Avant l'exposition au traitement, la réplication virale est intense b) Pendant l'exposition, le virus répliatif sensible est fortement réduit c) Sélection d'un virus muté résistant par des concentrations suboptimales d'ARV dans certains compartiments d) Sélection et réplication à haut niveau du virus muté lors de récurrences de concentrations sub-inhibitrices d'ARV, menant à l'échec virologique.

I.3.1.1. Mutations de résistance

Toute mutation apparue sur le génome viral ne confère pas systématiquement une résistance de ce dernier aux ARVs. Celles qui le font peuvent être subdivisées en deux types : les mutations « primaires », qui induisent directement une réduction de la sensibilité au traitement, et les mutations « accessoires » qui s'associent à l'effet des mutations primaires et/ou impactent sur la fitness virale. La plupart des mutations de résistance ne sont pas observées chez les patients naïfs au traitement, hormis les virus résistants transmis ; elles sont dites non-polymorphiques (Tang *et al.*, 2012). Selon les classes d'antirétroviraux, le nombre de mutations à développer pour observer une diminution de sensibilité est variable ; alors qu'une mutation est suffisante pour certaines classes (barrière génétique faible à la résistance), d'autres classes d'ARVs nécessitent l'accumulation de diverses mutations (barrière génétique élevée).

L'efficacité globale d'une molécule résulte de son activité antivirale intrinsèque estimée par la réduction de la charge virale (Log cp/mL) en monothérapie, associée à sa barrière génétique à la résistance qui est définie par le nombre de mutations entraînant une diminution de l'activité virologique.

I.3.1.3. Types de résistance

En fonction du type de mutation présent, les résistances peuvent être classées en deux catégories : les résistances majeures et les résistances mineures.

➤ **Les résistances majeures** sont dues à la présence de mutations dites primaires au sein du génome viral. C'est le cas de la mutation M184V qui confère une résistance à la Lamivudine et de la mutation Y181C qui confère une résistance à tous les INTI.

➤ **Les résistances mineures ou associatives** sont dues à la présence de mutations accessoires au sein du génome viral. Ces dernières doivent s'associer entre-elles chez un même individu ou être associées aux mutations primaires pour conduire à une résistance du virus à certains ARVs. Ces mutations sont regroupées en TAM (*thymidine analogue mutations*) à l'exemple de M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F et K219Q/E qui confèrent une résistance à l'ensemble des INTI, sauf à la Lamivudine (Jiamsakul *et al.*, 2014).

Dans l'ensemble, un échec thérapeutique chez un patient mis sous traitement serait dû à l'apparition d'une part des mutations primaires sur le génome viral, qui confèrent une résistance majeure ou directe du virus concerné à certaines molécules et, d'autre part, à l'apparition des mutations accessoires dont un certain nombre doivent être retrouvées au même moment sur le génome viral pour fragiliser la sensibilité du virus et entraîner des résistances

associatives à certains ARVs. Ces mutations sont communément appelés TAMs et confèrent des résistances appelés RAM ou *resistance-associated mutations* (Jiamsakul *et al.*, 2014).

I.3.1.3. Conséquences de la résistance aux ARVs

Selon Mann (1987), la pandémie du VIH s'est manifestée par trois épidémies ; la première a concerné la propagation du virus dans le monde entier, la seconde s'est traduite par la maladie du SIDA elle-même, et la troisième a été la réponse sociale, économique, culturelle et politique sur les deux premières épidémies, en particulier la discrimination subie par les personnes infectées (Mann, 1987). Plus de 30 ans après cette déclaration, on observe une diminution considérable du taux de mortalité des personnes infectées due à l'accès aux soins, ce qui a réduit avec succès l'évolution des deux premières épidémies. L'apparition de plus en plus fréquente des échecs thérapeutiques dus à la résistance aux TARVs pourrait être considérée comme la quatrième épidémie (Laborde-Balen *et al.*, 2018). Cette augmentation des échecs virologiques chez les adultes est plus signalée dans les pays à ressources limitées, avec des proportions variant de 5% à 31% après 12 mois de traitement mais pouvant aller jusqu'à 38% au-delà de 48 mois de traitement (Boender *et al.*, 2015). L'émergence des virus résistants aux TARVs est liée à une réplication résiduelle ; les virus portant des mutations dans les gènes codant pour les enzymes cibles des traitements sont alors sélectionnés et conduisent à des échecs thérapeutiques. Ces échecs virologiques ont des causes multiples qui sont la non adhésion aux traitements, l'utilisation des ARVs avec une faible barrière génétique, l'exposition aux ARVs par le biais de la prévention de la transmission mère--enfant. Cette situation met en évidence les limites des systèmes des soins de santé tout en relevant l'inégalité entre les pays. Dans les pays à ressources limitées, le coût assez élevé des molécules freine l'accès à la deuxième ligne de traitement et surtout à des molécules de troisième ligne ; cette situation limite les options thérapeutiques alors que l'OMS recommande l'utilisation des molécules à forte barrière génétique (WHO, 2017). Cette quatrième épidémie est susceptible d'affecter 3 millions de personnes entre 2020 et 2030 (Estill *et al.*, 2016). L'atteinte des objectifs ambitieux de L'ONUSIDA pour l'éradication de la pandémie à VIH d'ici l'an 2030 dépend du contrôle effectif de cette quatrième épidémie. Pour y arriver, la recherche et la surveillance de ces virus résistants constituent une étape indispensable pour un changement éventuel de traitement.

I.3.2. Méthodes de détermination des résistances et interprétations

Deux types de tests de détermination des résistances du VIH aux ARVs existent : les tests génotypiques et les tests phénotypiques. Les résistances phénotypiques permettent de

définir le caractère sensible ou résistant d'une souche virale vis-à-vis d'un antiviral après sa mise en culture, alors que les résistances génotypiques conduisent à analyser les mutations présentes dans le gène du virus étudié. Les résistances plus étudiées actuellement dans le monde sont génotypiques à cause de leur facilité de mise en évidence et d'évaluation.

I.3.2.1. Génotypes de résistance (test de résistance aux ARV)

L'analyse génotypique de résistance correspond au séquençage des gènes qui codent pour les cibles des ARVs utilisés. Le séquençage nucléotidique est effectué après amplification par « *polymerase chaine reaction* » (PCR) du gène d'intérêt, à partir de l'ADN complémentaire synthétisé à partir de l'ARN viral après rétro-transcription ou de l'ADN proviral. Le principe, qui repose sur la méthode de Sanger (1977), est réalisé avec des didéoxynucléotides, terminateurs de chaîne; les fragments obtenus sont séparés par électrophorèse. Les informations contenues dans les séquences sont comparées aux séquences de référence pour la recherche de mutations. Le test de résistance est basé sur la recherche des mutations existantes par rapport à une séquence de référence provenant du virus sauvage, c'est-à-dire premier cas décrit, « sensible » (traditionnellement HXB2 pour les VIH-1/M ou ANT70 pour les VIH-1/O) ; il est spécifiquement réalisé sur les résidus qui sont décrits pour induire une résistance aux molécules ARVs. Une interprétation de ces mutations est ensuite réalisée selon des règles définies sur des modèles statistiques qui associent des paires génotypes/phénotypes et des résultats de réponse virologique obtenus *in vivo*. Les algorithmes d'interprétation principalement utilisés et mis à jour périodiquement sont soit ceux de l'Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hépatites virales (ANRS) <http://www.hivfrenchresistance.org/>, soit ceux de l'Université de Stanford en Californie (<http://hivdb.stanford.edu>), ou de l'Institut Rega de Leuven en Belgique (<http://rega.kuleuven.be/cev/avd/software/rega-algorithm>) (Liu *et al.*, 2006). Par ailleurs, des sociétés commerciales proposent divers systèmes d'interprétation de la résistance génotypique ; c'est le cas de GeneSeq® (Monogram Biosciences), Viroseq® (Celera Diagnostics/Abbott®), Virocore® (Advanced Biological Laboratoires), et Smartgene HIV (Smartgene).

Selon les recommandations actuelles, une détermination génotypique de la résistance est souhaitable lors du bilan initial d'une infection à VIH, avant toute initiation thérapeutique et en cas d'échec virologique pour documenter la résistance et guider le choix de la nouvelle combinaison ARV (Philippe, 2018).

I.3.2.2. Phénotypes de résistance

Les tests phénotypiques permettent d'étudier un virus sous une forme infectieuse (pseudoparticules virales, virus recombinants, isolats cliniques...) dans des conditions d'infection de cellules de lignées exprimant l'un ou l'autre des co-récepteurs. L'analyse consiste à mesurer la réplication d'un virus en culture cellulaire, en présence de concentrations croissantes d'ARVs ; le processus de sélection de virus mutés impose de recourir à des doses plus élevées d'ARVs par rapport à celles qui sont nécessaires à une souche de référence dite « sensible » pour obtenir la suppression virale. Ainsi, la concentration du produit nécessaire à inhiber la croissance virale, *in vitro* de 50% ou 90% par rapport à l'inoculum de départ, définit une Concentration Inhibitrice 50% et 90% (respectivement CI50 et CI90). Plus cette concentration est élevée par rapport à celle observée chez le virus sensible, moins le virus est sensible à la molécule administrée ; il est donc déclaré résistant. La courbe dose-réponse obtenue, en y reportant le niveau d'inhibition de réplication en fonction de la dilution du médicament, prend l'allure d'une sigmoïde. Son point d'inflexion reflète la CI50 de la souche testée, exprimée en unité de concentration, généralement en nM ou μ M. Les résultats sont aussi rapportés à ceux obtenus pour un virus (ou un panel) de référence réputé sensible à la molécule étudiée ; on définit alors le niveau d'inhibition du virus testé par le rapport de sa CI50 avec celle du virus de référence ; ce qui donne ainsi un niveau de « *Fold Change* » (FC).

L'interprétation des tests phénotypiques est basée sur la définition du seuil de FC à partir duquel la molécule testée ne semble pas exercer l'effet escompté sur la réplication virale. Bien que difficile à établir, la définition de seuil clinique semble plus pertinente (Winters *et al.*, 2008; Pironti *et al.*, 2017b). Alors que la variabilité technique est un paramètre important à considérer sur les essais phénotypiques, la variabilité virale intrinsèque semble aussi jouer un rôle majeur dans la définition d'un seuil biologique (Parkin *et al.*, 2004). Malgré ces difficultés de standardisation, cette méthode permet une estimation directe et quantitative de la sensibilité des virus aux molécules antirétrovirales, même en présence de complexes de mutations. A l'inverse, le principal écueil est révélé par la discordance parfois observée entre une diminution d'efficacité *in vivo* et de très faibles variations de sensibilité *in vitro* (Parkin *et al.*, 2004).

I.3.3. Implication de la diversité génétique dans la résistance

L'impact de la diversité génétique sur les caractéristiques virales est bien connu et décrit à l'échelle des quasi-espèces rendant certains variants plus « fit » que d'autres c'est-à-dire capable de neutraliser la résistance de l'hôte. Toutefois, les conséquences de la forte divergence

des variants non-M sur les propriétés intrinsèques du virus soulèvent encore de nombreuses questions.

I.3.3.1. Fitness virale et adaptation à l'hôte

On entend par « fitness virale » la capacité répliquative d'un VIH-1 dans un environnement donné (Domingo *et al.*, 1997)). La fitness semble influencée par la diversité virale et par la résistance du virus aux ARVs, notamment lors de l'apparition de populations virales portant des mutations de résistance aux antirétroviraux (Harrigan *et al.*, 1998; Martinez-Picado *et al.*, 1999). Toutefois, la fitness des variants divergents est une problématique complexe où intervient la diversité génétique. Des essais de compétition en culture cellulaire ont montré que les souches de VIH-1/M présentent une meilleure fitness que celles des VIH-2 et surtout que les VIH-1/O sont 100 fois moins performants que le variant pandémique (Arien *et al.*, 2005). Pour autant, le VIH-1/O portant naturellement de mutations de résistance connues pour les VIH-1/M, telles que les mutations A98G, V179E et Y181C sur la TI, présentent une meilleure fitness comparés aux mêmes virus non mutés (Tebit *et al.*, 2010). Ces observations suggèrent que le génotype naturellement muté des VIH-1/O n'a pas d'effet délétère sur la fitness virale contrairement à ce qui est observé pour les VIH-1/M, chez qui ces mêmes mutations sont sélectionnées par un traitement ARV.

La capacité adaptative des variants non-M du VIH-1 serait liée à leur potentiel d'adaptation aux caractéristiques de leur hôte. Un facteur viral d'adaptation spécifique à l'hôte a été identifié en position 30 du gène *gag*. L'étude de la nature des résidus présents à cette position, au sein de séquences de virus simiens et humains, a montré la conservation d'une méthionine (M) ou d'une leucine (L) chez les VIScpz, alors qu'un acide aminé basique de type arginine (R) ou lysine (K) est systématiquement présent au sein des lignées originelles de VIH-1. Des études de mutagenèse dirigée ont ainsi révélé l'avantage répliquatif spécifique d'hôte conféré par l'une ou l'autre des mutations. Les virus mutés pour M ou L en Gag-30 présentent des titres plus élevés dans des cellules issues de chimpanzés, alors qu'on observe le même phénomène sur des cellules humaines seulement avec les virus mutés pour R ou K à cette même position. Ces résultats soulignent l'importance de la pression de sélection exercée spécifiquement par l'hôte sur le virus ; ils définissent également la protéine Gag comme un modulateur de l'adaptation virale. L'analyse de cette position a été réalisée pour les deux souches du groupe P lors de l'évaluation de l'impact de leur potentiel adaptatif sur leur diffusion. La souche prototype RBF168 du groupe P exprime un résidu M en Gag-30 qui rend cette souche humaine plus proche des VISgor et VIScpz porteurs de ce même résidu que des

autres VIH. Paradoxalement, la seconde souche 06CMU14788 témoignerait d'une adaptation à l'homme du fait de la présence d'un résidu basique (Vallari *et al.*, 2011).

I.3.3.2. Résistance des groupes O

Il n'existe pas de recommandations spécifiques pour la prise en charge thérapeutique des patients infectés par un variant non-M, et plus particulièrement les VIH-1/O. Quelques études ont montré que les infections par les VIH-1/O ont une histoire naturelle proche de celle des VIH-1/M (Nkengasong *et al.*, 1997; Tebit *et al.*, 2010). Les mêmes critères de mise sous traitement sont donc appliqués. De plus, aucun algorithme spécifique d'interprétation des résistances pour les variants VIH-1/O n'est pour l'instant disponible. De ce fait, l'utilisation des algorithmes définis pour le VIH-1/M dans l'analyse des mutations n'est qu'indicative et exige beaucoup de précautions dans l'interprétation (Delaugerre *et al.*, 2011). L'une des particularités des VIH-1/O est leur résistance naturelle aux Inhibiteurs Non Nucléosidiques de la TI (INNTI) due à la présence de la mutation Y181C dans la TI. Cette mutation est présente dans plus de 65% des souches (Leoz *et al.*, 2015) mais l'observation des sensibilités variables aux INNTI, même en l'absence de cette mutation, exclut l'utilisation de cette classe d'ARVs pour l'ensemble des VIH-1/O (Descamps *et al.*, 1997; Depatureaux *et al.*, 2010; Tebit *et al.*, 2010). Concernant les Inhibiteurs de Protéase (IP), les VIH-1/O ne présentent pas naturellement de mutations majeures de résistance mais le très grand polymorphisme de ces souches se traduit soit par un nombre élevé de mutations mineures décrites pour le groupe M, soit par des mutations atypiques dont les conséquences sont encore méconnues (Depatureaux *et al.*, 2010).

En ce qui concerne l'Intégrase, son site actif semble bien conservé et l'utilisation des Inhibiteurs d'Intégrase (II) apparaît possible. Les études récentes ont montré que la sélection des mutations Q148R et N155H conduit à une résistance plus élevée comparée à celle des VIH-1/M (Depatureaux *et al.*, 2015). Au niveau de l'enveloppe, l'utilisation de l'Enfuvirtide semble possible malgré la présence de la mutation N42D, qui confère une résistance des VIH-1/M dans près de 100 % des souches VIH-1/O (Poveda *et al.*, 2005; Depatureaux *et al.*, 2010).

Les différentes données présentées ci-dessus montrent que la forte diversité génétique des VIH-1/O a encore des conséquences sur le diagnostic, le traitement et le suivi des patients. Leur implication dans des doubles infections et formes recombinantes peut donc avoir un impact important sur le dépistage et la prise en charge de ces infections particulières.

I.3.3.3. Résistance des VIH-2

Comme avec les VIH-1/O, les protocoles de traitement pour les VIH-2 sont quasiment inexistant. Le traitement des patients infectés par ces virus est calqué sur le modèle des VIH-1/M. Cependant, en 2013, il a été montré une résistance naturelle des VIH-2 aux inhibiteurs non-nucléotidiques de la transcriptase inverse comme observées chez les variants VIH-1/O (Ayoub *et al.*, 2013). Ce qui rend la prise en charge des patients infectés par ce type viral assez complexe. Néanmoins, la fitness assez lente des VIH-2 et la progression très lente de ces virus par rapport aux VIH-1 sont en faveur d'une mise sous traitement tardive.

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1. Cadre et lieu d'étude

Pour atteindre les objectifs que nous nous sommes fixés dans ce travail, les analyses ont été réalisées d'une part au laboratoire de Virologie du Centre Pasteur du Cameroun (CPC) et, d'autre part, au Laboratoire de Virologie du CHU de Rouen. Au Cameroun, le CPC est le laboratoire national de référence pour le diagnostic et le suivi biologique des patients vivant avec le VIH (PVVIH). Ainsi, le laboratoire de Virologie du CPC reçoit chaque jour dans le cadre de ses activités, des échantillons venant de toutes les régions du pays pour le dépistage, la confirmation du diagnostic de l'infection à VIH et pour le suivi des patients impliquant la réalisation des charges virales et/ou un test de résistance de ce virus aux ARVs.

II.2. Populations d'étude

Nos travaux ont porté sur deux types d'échantillons:

- d'une part sur des échantillons de patients venus au Centre Pasteur du Cameroun soit pour un dépistage sérologique du VIH, soit pour un test de résistance de ce virus aux ARVs;
- d'autre part sur les échantillons de sérologie VIH positive issus de l'enquête démographique de santé (EDS) de 2011.

Sur les échantillons des patients venus au CPC, pour le volet dépistage du VIH, nous avons mené une étude rétrospective de janvier 2010 à juin 2014 puis, une étude prospective de juillet 2014 à décembre 2016. Concernant le test de résistance du VIH aux ARVs, la première partie de notre étude a été rétrospective de septembre 2013 à juin 2014, et la seconde partie prospective de juillet 2014 à décembre 2016. Toutes ces analyses ont été réalisées sur des plasmas des différents échantillons recueillis.

Concernant l'enquête démographique de santé, environ 14700 prélèvements de sang séché sur papier buvard ou *Dried Blood Spot (DBS)* ont été collectés sur l'étendue du territoire national en 2011. Ces prélèvements ont été obtenus de 11556 ménages constitués de femmes âgées de 15 à 49 ans et d'hommes âgés de 18 à 59 ans. L'échantillonnage a été stratifié de façon à fournir une représentation adéquate des milieux urbain et rural de 12 domaines d'étude constitués des 10 régions du Cameroun et des villes de Douala et Yaoundé. Tous ces échantillons ont été conservés à -80°C au CPC. Au cours de l'EDS, 673 DBS ont été déclarés VIH positifs et ont été utilisés au laboratoire de virologie du CPC d'une part pour la détermination des différents variants de VIH circulant au Cameroun et, d'autre part au laboratoire de Virologie du CHU de Rouen-France pour la recherche des résistances dans la population camerounaise.

- **Considération éthique**

L'étude menée sur les échantillons des patients venus au CPC, a été réalisée dans le cadre de la mission de santé publique du CPC qui confère à cette structure en accord avec le Ministère de la Santé Publique du Cameroun l'autorisation d'utiliser de façon anonyme, les résultats d'analyses des patients réalisées dans ladite structure. Ceci dans le but de mettre à jour les données sur certaines pathologies au Cameroun. Une autorisation administrative (disponible annexe 5) nous a été donnée par le CPC pour l'exploitation de ces données.

En ce qui concerne les échantillons de l'enquête démographique de santé, nos travaux sont l'un des objectifs secondaires de l'étude portant sur l'épidémiologie des hépatites B, C et delta au Cameroun sur les échantillons de l'EDS-2011 et, interviennent à la suite de cette enquête dans le but de finaliser la caractérisation des positifs obtenus au cours de l'EDS. Une clairance éthique disponible en annexe 6 avait été octroyée.

II.3. Méthodes

II.3.1. Dépistage du VIH et détermination des différents variants

Le dépistage de l'infection à VIH et la discrimination de ses différents variants ont été réalisés sur les deux populations d'étude selon l'algorithme mis en place par le CPC (fig. 15).

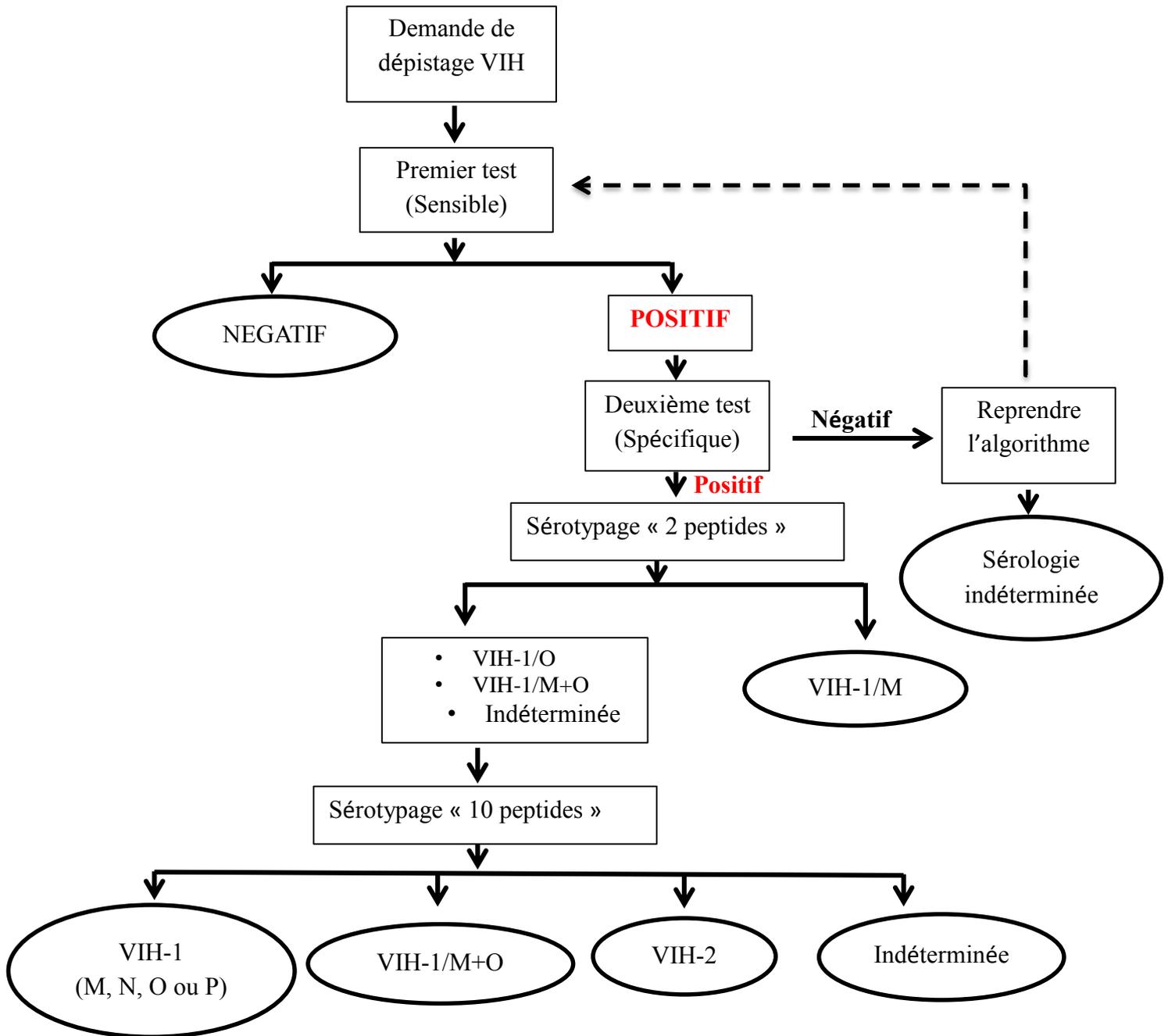


Figure 15 : Algorithme simplifié de dépistage sérologique du VIH et ses différents variants

Globalement, un premier test est réalisé sur tous les échantillons reçus. Selon l'algorithme utilisé, lorsque le résultat est négatif, le patient est considéré non infecté par le VIH ; par contre lorsque le résultat est positif, un second test de confirmation est entrepris. En cas de positivité, l'échantillon est considéré positif au VIH. Si le second test est négatif, l'algorithme est repris à partir du premier test. Au cas où les mêmes résultats sont obtenus, l'échantillon est considéré de sérologie VIH indéterminée. Les tests utilisés pour le dépistage

du VIH dépendaient des produits biologiques de départ : plasma ou DBS. Tous les échantillons qui ont été conclus positifs suivant l'algorithme du CPC ont été sérotypés. Ce sérotypage a d'abord été réalisé sous un format deux peptides (V3M et V3O/sous-groupe H) et en fonction des résultats obtenus sous format dix peptides (gp41/36 (VIH- 1/M, N, O et VIH-2/Sm) et V3 (VIH- 1/M, N, O/sous-groupe H, O/consensus, P et VIH-2/Sm).

II.3.1.1. Tests sérologiques utilisés pour le dépistage du VIH

Pour le dépistage du VIH, les tests sérologiques utilisés ont été spécifiques au type d'échantillon étudié (échantillons de routine ou EDS). De façon globale, les algorithmes dont nous nous sommes servis s'appuient sur les recommandations de l'OMS et les recommandations nationales, qui préconisent l'utilisation de deux tests sérologiques de principes différents (WHO, 2013).

➤ Dépistage du VIH sur les échantillons reçus en routine au CPC

Le dépistage de l'infection à VIH au CPC repose sur l'emploi des tests sérologiques de 4^{ème} génération, qui mettent en évidence l'antigène p24 (Ag p24) et les anticorps anti-VIH (test combiné). Ainsi, au CPC sont retenus les tests Architect HIV Ag/Ab Combo (Abbott diagnostics, Wiesbaden, Allemagne), Genscreen ULTRA HIV Ag-Ab (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) et Genie III HIV-1/HIV-2 (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

• Architect HIV Ag/Ab Combo

Ce test est fait en première intention ; il est réalisé avec l'automate ARCHITECT Plus i1000 SR (Abbott diagnostics, Wiesbaden, Allemagne). Son principe est basé sur le dosage immunologique, en deux étapes, de l'Ag p24 puis des anticorps anti-VIH-1 et anti-VIH-2 présents dans le sérum ou le plasma humain. Il s'agit d'une technologie de dosage microparticulaire par *chemiluminescent microparticle immunoassay* (CMIA), dont le réactif contient les protéines transmembranaires des VIH-1/M, O et du VIH-2 ainsi que les anticorps anti-p24. La réaction de chimiluminescence est mesurée en unités relatives de lumière (URL); il existe une relation directe entre la quantité d'antigènes du VIH et/ou d'anticorps anti-VIH présents dans un échantillon et les URL détectées par le système optique de l'automate. La présence ou l'absence d'Ag p24 ou des anticorps anti-VIH dans un échantillon est déterminée en comparant le signal chimiluminescent de la réaction au signal de la valeur seuil déterminée lors de la calibration. Une valeur appelée S/CO (« *Signal to cutt-off* ») est alors déterminée pour chaque échantillon et l'interprétation est la suivante :

- si $S/CO \geq 1$, l'échantillon est considéré **réactif, donc positif** pour l'Ag p24 du VIH et/ou les anticorps anti-VIH ;

- si $S/CO < 1$, l'échantillon est considéré **non réactif, donc négatif** pour l'Ag p24 du VIH et/ou les anticorps anti-VIH.

Le dosage Architect Ag/Ab Combo ne permet pas de distinguer la réactivité due à l'Ag p24 de celle due aux anticorps anti-VIH.

- Genscreen ULTRA HIV Ag-Ab

Pour les échantillons positifs au premier test, ce résultat a été confirmé ou non par le test Genscreen ULTRA HIV Ag-Ab (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). Il s'agit d'un test sérologique en microplaque de type ELISA sandwich qui permet de détecter la présence de l'Ag p24 et les différents anticorps anti-VIH-1 et/ou VIH-2 dans le sérum ou le plasma humain. Les puits de la microplaque (phase solide) sont cotés avec :

- les anticorps monoclonaux anti-p24 du VIH-1,
- les antigènes purifiés, c'est-à-dire le mélange d'une protéine recombinante gp160 du VIH, d'un peptide synthétique mimant un épitope artificiel spécifique du VIH-1/O, et de peptides mimant la protéine immuno-dominante de l'enveloppe du VIH-2.

Dans ce test, deux conjugués sont utilisés :

- le conjugué 1 constitué des anticorps polyclonaux biotynilés anti-p24,
- le conjugué 2 constitué de la streptavidine et de la peroxydase couplée aux antigènes du VIH (peptides gp41 et gp36 mimant les épitopes immunodominants des glycoprotéines du VIH-1 et VIH-2, et le même peptide que celui de la phase solide mimant un épitope artificiel spécifique du VIH-1/O).

L'analyse est faite manuellement suivant les recommandations du fabricant. La présence ou l'absence de l'Ag p24 ou des anticorps anti-VIH-1 et/ou VIH-2 dans un échantillon est déterminée en comparant son absorbance à la valeur seuil, qui est la moyenne des absorbances des 3 contrôles négatifs + 0,200. Ainsi, l'interprétation est la suivante :

- si la **D.O de l'échantillon** < valeur seuil, alors le résultat est **négatif** ;
- si la **D.O de l'échantillon** \geq valeur seuil, le résultat du test est **positif** ;
- si la **D.O de l'échantillon** < valeur seuil - 10%, l'échantillon doit être retesté.

- Genie III HIV-1/HIV-2

Le test Genie III HIV-1/HIV-2 (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) est rapide, unitaire et discriminant. Basé sur la technique d'immunochromatographie, il permet une

détection qualitative, rapide et fiable des anticorps anti VIH-1 et anti VIH-2 dans le sérum, le plasma et le sang total humain sans instrumentation.

Il se présente sous la forme d'une cassette portant deux fenêtres: une fenêtre-échantillon et une fenêtre-test. Cette dernière donne accès à une membrane de nitrocellulose où d'une part des antigènes, présents sous forme de protéines recombinantes des régions immunodominantes. Ces protéines codées par les gènes *env* et *gag* du VIH-1, sont immobilisés sur une ligne test VIH-1 et, d'autre part, un peptide synthétique du VIH-2 est immobilisé sur la ligne test VIH-2. Des anticorps anti-IgG humaines sont également immobilisés sur une ligne C (contrôle) dans cette même fenêtre. Par ailleurs, des protéines VIH-1 et VIH-2 liées à de l'or colloïdal et des immunoglobulines humaines non dirigées contre les VIH, liées également à ce même support, sont adsorbées sur une bandelette placée entre la fenêtre échantillon et la fenêtre test.

L'analyse des échantillons sur cette cassette se déroule selon les étapes suivantes:

- dépôt de l'échantillon dans la fenêtre échantillon ;
- ajout de deux gouttes de solution de lavage pour faciliter la migration de l'échantillon ;
- migration des complexes anticorps-antigène marqués à l'or et des anticorps marqués à l'or si patient est infecté ; ou des anticorps du patients, des antigènes marqués à l'or et des anticorps marqués à l'or si patient non infecté ;
- fixation des complexes ainsi formés sur les antigènes VIH situés sur la fenêtre test pour le patient infecté et des anticorps marqués à l'or sur le contrôle interne que le patient soit infecté ou non.

Les résultats du test sont interprétés suivant l'apparition ou non d'une bande de coloration rose/rouge traduisant la présence ou l'absence dans l'échantillon des anticorps anti-VIH-1 sur la ligne VIH-1 et/ou anticorps anti-VIH-2 sur la ligne VIH-2, selon que le patient est infecté ou non, et l'apparition dans les deux cas d'une bande aussi de couleur rose/rouge pour le contrôle de validité du test.

Le résultat du test est déclaré positif si un trait rose/rouge apparaît sur:

- la ligne du contrôle interne et sur la ligne VIH-1 et/ou sur la ligne VIH-2.

Ce qui traduit la présence dans l'échantillon, des anticorps anti-VIH-1 ou anti VIH-2, ou encore d'anticorps dirigés contre les deux virus.

Le résultat est par contre négatif si :

- le trait rose/rouge apparaît uniquement sur la ligne du contrôle interne.

La présence du trait de contrôle interne valide l'analyse ; s'il est absent, l'analyse doit être reprise. De plus, toute bande même de faible intensité sur les lignes tests représente un résultat positif.

- Dépistage du VIH à partir des échantillons collectés dans la population générale camerounaise (EDS 2011)

L'algorithme utilisé dans le cadre du dépistage du VIH sur les échantillons de l'enquête démographique de santé a retenu le Murex HIV Ag/Ab combo (DiaSorin, S.P.A UK Branch) en premier test et le Genscreen Ultra HIVAg-Ab (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) comme deuxième test. Les échantillons dont les résultats ont été discordants entre les deux tests ont été re-testés par le Western Blot (New LAV Blot, Biorad) ; ceux qui se sont révélés positifs ont été sérotypés pour déterminer la prévalence des différents variants de VIH.

- Murex HIV Ag/Ab combo

Murex HIV Ag/Ab Combinations est un test sur un support microplaque dont les cupules sont recouvertes :

- d'un peptide synthétique représentatif d'une région immunodominante du VIH-1 (groupe O) ;
- d'une protéine recombinante dérivée des protéines de l'enveloppe du VIH-1 et du VIH-2 ;
- d'une protéine codée par le gène polymérase du VIH ;
- d'anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine p24 du VIH-1.

Le conjugué est un mélange des mêmes épitopes d'antigènes et des différents anticorps monoclonaux également dirigés contre la p24, tous marqués à la peroxydase de raifort.

Les échantillons à analyser et les contrôles sériques sont incubés dans les cupules ; les antigènes de core du VIH et/ou les anticorps anti VIH présents dans l'échantillon ou les contrôles sériques se lient aux anticorps et/ou aux antigènes sur la cupule. L'échantillon et tout excès d'anticorps sont éliminés par lavage. Par la suite, le conjugué est ajouté dans les différentes cupules et se lie à tout antigène core et/ou aux anticorps spécifiques déjà attachés aux réactifs sur la cupule. Les échantillons ne contenant pas l'antigène core ni l'anticorps spécifique n'entraînent pas la fixation du conjugué à la cupule. Le conjugué non lié est éliminé par lavage et une solution contenant la 3,3', 5,5'- tétraméthylbenzidine (TMB) et de l'eau oxygénée est ajoutée aux cupules. Les cupules ayant fixé le conjugué développent une coloration bleue/verte qui vire à l'orange et peut être lue à 450 nm, une fois que la réaction a été stoppée par l'acide sulfurique.

L'interprétation des résultats est faite après le calcul de la moyenne des 3 contrôles négatifs (MC-) et celui de la valeur seuil $VS = MC- + 0,150$.

La présence ou l'absence d'Ag p24 ou des anticorps anti-VIH-1 et/ou VIH-2 dans un échantillon est déterminée en comparant l'absorbance de l'échantillon à la VS. Ainsi, si :

- **D.O de l'échantillon < valeur seuil, alors le résultat du test est négatif ;**
- **D.O de l'échantillon \geq valeur seuil, le résultat du test est positif.**

- Genscreen Ultra HIVAg-Ab

Les échantillons révélés positifs au premier test ont subi un test de confirmation Genscreen ULTRA HIV Ag-Ab dont le principe a déjà été décrit plus haut (à la page 62).

- Western Blot (NEW LAV BLOT)

Le test Western Blot a été réalisé avec le kit NEW LAV BLOT (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). C'est une technique d'ELISA indirect sur bandelette de nitrocellulose sur laquelle des protéines constitutives du VIH ainsi qu'un contrôle interne anti-IgG ont été fixés. Les protéines inactivées du VIH sont séparées, par électrophorèse en fonction de leur poids moléculaire sur du gel de polyacrylamide, en milieu dénaturant et réducteur puis elles sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. Une bande correspondant au contrôle interne située en fin de bandelette, sans numéro d'identification mais avant la protéine P18 permet de valider l'analyse après ajout d'un échantillon et des réactifs. L'analyse est faite selon les recommandations du fabricant. Pour la validation du test :

- la bande de contrôle interne doit apparaître sur toutes les bandelettes ;
- sur le témoin positif, toutes les bandes correspondant aux protéines virales doivent être révélées (figure 16) ;
- seule la bande de contrôle interne doit être visible sur le témoin négatif (figure 16).

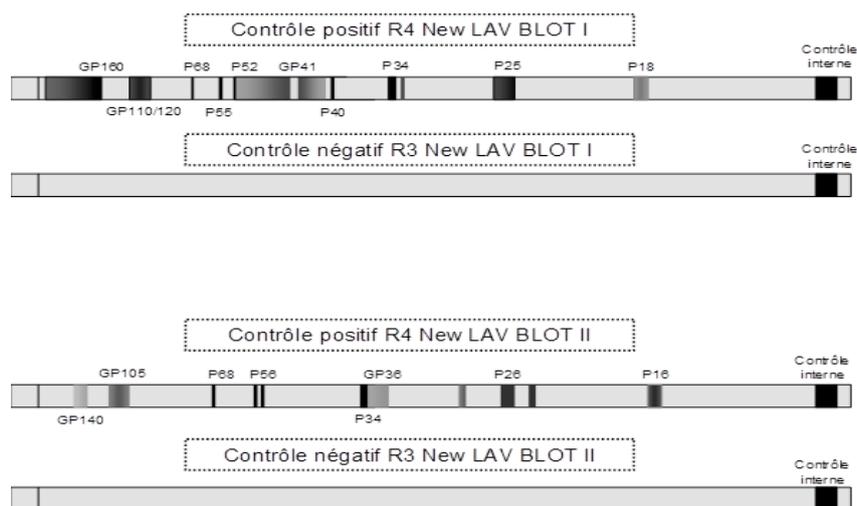


Figure 16 : Profil des témoins positifs et négatifs (VIH 1 et 2) D'après mourez *et al.*, 2013

L'échantillon est déclaré positif au test lorsque l'on révèle la présence :

- pour le VIH-1 d'au moins deux glycoprotéines d'enveloppe ENV (gp 41 et gp 160 ou 120) + une protéine Gag ou une protéine Pol ;
- pour le VIH-2 d'au moins une glycoprotéine d'enveloppe ENV (gp36, gp 105 ou gp 140) + une protéine Gag et une protéine Pol.

L'échantillon est dit négatif au test lorsqu'aucune bande, hormis celle du contrôle Interne, n'est visible

L'échantillon a un statut indéterminé dans deux cas, soit en début de séroconversion, soit lors d'une réaction non spécifique. Il est alors recommandé de refaire un contrôle sur un deuxième prélèvement effectué trois semaines après le premier.

II.3.1.2. Détermination des différents variants du VIH

Les différents variants du VIH ont été déterminés par un sérotypage qui est une technique d'ELISA manuelle indirecte, dite « maison », permettant de discriminer les différents types de VIH (VIH-1 et VIH-2) ainsi que les différents groupes du VIH-1 (M, N, O, P) et les doubles réactivités (M+O). Cette technique est basée sur l'utilisation d'antigènes peptidiques représentatifs de la région gp41 et de la boucle V3 de la gp120, spécifiques de type et des groupes de VIH (Simon *et al.*, 2001; Kfutwah *et al.*, 2013a). Ce test est réalisé suivant deux formats. Le format simple, appelé « deux peptides » emploie uniquement les peptides de la boucle V3 des VIH-1 des groupes M et O (V3M et V3O/sous-groupe H) (tableau I). Dans ce cas, tous les échantillons présentant une réactivité uniquement en V3M sont considérés VIH-1/M positifs. Le format complet, appelé « dix peptides », utilise quatre peptides de la gp41/36

(VIH-1/M, N, O et VIH-2/Sm) et six peptides de boucle V3 (VIH-1/M, N, O/sous-groupe H, O/consensus, P et VIH-2/Sm) ; il a permis de tester les échantillons réactifs en V3O, doubles réactifs en V3M et V3O ou négatifs, Les séquences des différents antigènes peptidiques utilisés sont présentées dans le tableau 1 ci-après.

Tableau I : Antigènes peptidiques utilisés pour le sérotypage

Antigène peptidique	Séquence en acides aminés	Références
gp41 VIH-1/M (sous-type B)	RVLAVERYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAV*	(Mauclere <i>et al.</i> , 1997)
gp41 VIH-1/N	LAIERYLRDQQILSLWGCSGKTIC	(Simon <i>et al.</i> , 2001)
gp41 VIH-1/O (sous-groupe H)	LALETLIQNQQLNLWGCKGKLIC #	
gp41 SIVsm (VIH-2)	TAIEKYLKDQAQLNSWGCAFRQVC	
V3 VIH-1/M sous-type A (consensus 1995)	NNTRKSVHIGPGQAFYATGDIIGDIRQAHC	(Barin <i>et al.</i> , 1996)
V3 VIH-1/O (sous-groupe H)	NNTGGQVQIGPAMTFYNIKIVGDIRQA#	(Simon <i>et al.</i> , 2001)
V3 VIH-1/N	IDIQEMRIGPMAWYSMIGGTAGNSSRAA	(Barin <i>et al.</i> , 2006)
V3 VIH-1/O (consensus, 2006)	NLTVQEIKIGPMAWYSMGLAAGNGNSRAYC #	
V3 VIH-1/P	NNTRGQIQVGPLTIYNSENIIGNTRKAF	(Kfutwah <i>et al.</i> , 2013b)
V3 SIVsm (VIH-2)	NKTVLPVTIMSGLVFHSQPINERPKQA	(Simon <i>et al.</i> , 2001)

*Séquence dérivée de la souche HXB2, considérée comme prototype des VIH-1/M.

Séquence dérivée de la souche ANT70, considérée comme prototype des VIH-1/O, anciennement clade A.

➤ Sérotypage deux peptides

Il s'agit d'une technique type ELISA manuel qui se sert de deux antigènes peptidiques représentatifs de la boucle V3 de la gp120, spécifiques de groupe de VIH-1 M et O (Barin *et al.*, 2006). L'antigène de détection des VIH-1/M est connu suffisamment performant pour couvrir la grande diversité de ce groupe. Un peptide V3M est utilisée pour la détermination les VIH-1 M. Dans le but de couvrir la diversité antigénique des variants de VIH-1 O, un antigène groupe O (clade A) a été employé. Cette technique est depuis de nombreuses années utilisée en routine au CPC (Vessiere *et al.*, 2010b) ; elle a permis de distinguer les échantillons positifs VIH-1 M, VIH-1 O sous-groupe H, et les doubles infections (M+O).

➤ Sérotypage dix peptides

Les échantillons dont le sérotype a été réactif en O, double réactif en M+O ou indéterminé en 2 peptides, ont été ré-analysés avec un format 10 peptides basé sur l'utilisation de 4 antigènes de gp41/gp36 (du VIH-1 M, N, O/A, et HIV-2) et 6 antigènes représentatifs de la boucle V3 de la gp120, spécifiques des groupes VIH-1 M, N, O/H, O/Consensus, P, et VIH-2. Cette technique a permis de discriminer les différents variants du VIH (VIH-1 M, VIH-1 O, VIH-1 N, VIH-1P, VIH-2) et les doubles réactivités M+O.

➤ Mode opératoire de l'ELISA

Les « *dried blood spot* » (DBS) collectés au cours de l'EDS ont été découpés et élués avec une solution contenant du « phosphate buffer saline (PBS) » et du chlorure de sodium à 0,9M. Les éluats obtenus ont servi à la détermination par sérotypage des différents groupes de VIH circulant dans la population générale au Cameroun. Pour les échantillons de patients reçus en routine, le plasma a été utilisé pour le sérotypage.

Les plaques de quatre-vingt-seize puits, de type maxisorp-nunc (Thermo scientific, Waltham, Massachusetts, USA), ont été sensibilisées avec les différents antigènes peptidiques (PolyPeptide Group, Strasbourg, France) et incubées pendant une nuit à 37°C dans une chambre humide de l'étuve. Après lavage avec du tampon PBS-Tween 20 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) à 0,5%, la saturation des sites non occupés a été faite à l'aide d'une solution de PBS-SVFD (Gibco-Life Technologies, Gaithersburg, USA) à 3%, suivie d'une incubation à 37°C pendant 45 minutes. Les plaques ont ensuite été lavées et séchées. Les échantillons et les contrôles (négatifs et positifs VIH-1/M et VIH-1/O) ont été dilués au 1/100^e dans un tampon constitué de PBS-NaCl 0,75M (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA)-SVFD 10%-Tween 20 à 0,05%. Cent microlitres (100 µL) ont été distribués dans les puits correspondants, ensuite incubés à la température ambiante pendant 30 minutes puis lavés quatre fois (PBS-Tween 20 à 0,5%). Cent microlitres (100 µL) du conjugué [F(ab')₂ anti human IgG(γ)-Peroxydase; Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA], dilués au 1/200^e dans le même tampon que les échantillons, ont été distribués dans chaque puits, ensuite incubés à la température ambiante pendant 30 minutes puis lavés quatre fois. La révélation a ensuite été faite après la distribution de 100 µL de substrat OPD (O-phenylène diamine, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) dans les différents puits suivie de l'incubation à la température ambiante pendant 15 minutes à l'obscurité. L'ajout de 50 µL d'une solution de H₂SO₄, 2N dans chaque puits a arrêté la réaction, ensuite les densités optiques ont été lues à 492nm (référence à 620 nm) à l'aide d'un lecteur de plaque PR 3100

TSC (Bio-Rad). Au cours des travaux préliminaires, le seuil de positivité a été défini à 0,350. C'est ainsi que :

- **si la DO \geq 0,350, le test a été déclaré positif pour le peptide correspondant ;**
- **si la DO $<$ 0,350, le test a été conclu négatif pour le peptide correspondant.**

Notons que le sérotype du VIH n'a pas toujours pu être déterminé en raison de la grande diversité antigénique, l'état immunologique du patient, la primo-infection (Simon *et al.*, 2001; Vergne *et al.*, 2003; Yamaguchi *et al.*, 2004; Vessiere *et al.*, 2010b). En cas d'échec de sérotypage, l'échantillon a été conclu être d'un sérotype indéterminé.

II.3.2. Caractérisation moléculaire des variants non M obtenus

Après sérotypage, tous les échantillons conclus positifs en sérologie et identifiés non M ont subi une analyse moléculaire. En fonction du produit biologique de départ, plasma ou DBS, une extraction de l'ARN ou de l'ADN a été faite suivie de l'amplification, par RT-PCR nichée ou PCR spécifique, des variants concernés. Le séquençage des produits amplifiés et les analyses phylogénétiques ont ensuite été faits.

II.3.2.1. Extraction des acides nucléiques (ARN et ADN)

L'extraction des acides nucléiques a consisté en la séparation de l'ARN ou de l'ADN, chargé négativement des autres constituants du produit biologique, sur une colonne de silice de polarité positive par chromatographie échangeuse d'ions, après une lyse des membranes cellulaires, une précipitation des produits obtenus, une adsorption de acide nucléique, enfin un lavage et une élution de ce dernières.

Deux techniques d'extraction ont été utilisées en fonction des produits biologiques, c'est-à-dire l'ARN pour le plasma et l'ADN pour le DBS.

➤ Extraction de l'ARN

Cette manipulation a été réalisée à l'aide du kit QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Tout d'abord, 800µL de tampon AVL ont été introduits dans 200µL de plasma de chaque échantillon. Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 10 minutes. Huit cents microlitres (800µL) d'éthanol absolu ont ensuite été ajoutés à chaque échantillon ; le mélange a été transféré sur des colonnes de silice et centrifugé à 6000g pendant une minute. Deux lavages successifs avec 500µL des tampons AW1 et AW2, respectivement, ont été ensuite appliqués avec, une centrifugation à 6000g pendant 1 minute pour AW1 et

20000g pendant trois minutes pour AW2. Enfin, l'ARN a été décroché de la colonne avec 60µL d'eau dépourvue d'RNase et DNase.

➤ Extraction de l'ADN

L'ADN intracellulaire, quant à lui a été extrait à partir des échantillons de DBS collectés au cours de l'EDS de 2011. Un des quatre *spots* de sang séché a été découpé dans les différents DBS et l'extraction de l'ADN sur chaque *spot* a été faite avec le kit QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Brièvement, le *spot* découpé est introduit dans un tube et mélangé avec 360µl de tampon ATL à 85°C pendant 10min. Par la suite, 40µl de protéinase K sont ajoutés dans le mélange et l'ensemble est incubé pendant 1h à 56°C. Une lyse cellulaire est par la suite réalisée en ajoutant 350µl de tampon AL dans le mélange précédant et l'ensemble est incubé pendant 10min à 70°C. Une fois cette incubation terminée, 350µl d'éthanol sont ajoutés dans le tube. Tout le surnageant contenu dans ce tube est ensuite transféré sur une colonne de silice. Des centrifugations successives permettent la fixation de l'ADN sur la membrane de silice et les contaminants sont éliminés par deux séries de lavage avec 500µl des tampons AW1 et AW2 respectivement comme pour l'extraction de l'ARN. L'ADN purifié est ensuite décroché de la membrane de silice par ajout de 150µl de tampon AE contenu dans le kit.

II.3.2.2. Réalisation des PCRs

Les (RT-) PCR ont été réalisées en fonction du variant VIH caractérisable, soit VIH-1 (O, N, double infection M+O) soit VIH-2. Pour la plupart de ces variants, deux gènes ont été ciblés : celui de la polymérase (Pol) et celui de l'enveloppe (Env). Sur le gène de la polymérase, trois régions ont été retenues : la Protéase (PR), Transcriptase Inverse (TI) et l'Intégrase (IN). Concernant le gène de l'enveloppe, seule la région Gp41 a été amplifiée.

Toutes ces différentes (RT-) PCR ont été réalisées en deux étapes en utilisant deux couples d'amorces différentes, spécifiques chacune d'une région ciblée. Le premier couple est dit externe et le deuxième dit interne ou niché. Les séquences des différentes amorces sont représentées dans l'Annexe 1. Le kit utilisé pour la RT-PCR externe était la « *Superscript III One-Step RT-PCR Platinum Taq HIFI* » (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad-Californie), tandis que le kit employé pour les PCRs externe et interne était le coffret « *HotStar Taq Master Mix* » (Qiagen). Le volume final du mélange réactionnel dans tous les essais d'amplification était de 50µl, soit 40µl de PCR-mix et 10µl d'extrait ARN ou ADN pour la première (RT-) PCR externe, soit 48µl de PCR-mix et 2µL du produit de première PCR ou RT-PCR pour la PCR interne. Un thermocycleur GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem) a servi aux

différentes amplifications. Le profil thermique a été spécifique des différentes (RT-) PCR réalisées.

- PCR spécifiques des variants VIH-1/O et doubles infections VIH-1/M+O

Tous les échantillons qui se sont révélés positifs pour les peptides du groupe O en sérotypie et pour les peptides des groupes M et O ont subi des PCR (pour les DBS) ou en RT-PCR (pour les plasmas) spécifiques de chaque groupe.

Les (RT-) PCR PR et TI ont été mises au point pour l'analyse des mutations de résistances du VIH aux antirétroviraux dans le gène polymérase de chaque groupe, en référence à la technique ANRS pour VIH-1/M et celle du CHU de Rouen, CNR pour VIH-1/O (Yang *et al.*, 2000; Vessiere *et al.*, 2010b). L'amplification de la RT-PCR externe a été réalisée successivement à 50°C pendant 30min, 94°C pendant 5min, 35 cycles (94°C pendant 30s, 55°C pendant 30s et 68°C pendant 1 min 30s) pour le VIH-1/M (ou 2min pour le VIH-1/O), enfin une extension finale à 68°C pendant 10min. L'amplification pour la PCR interne a été faite successivement à : 94°C pendant 5min, 35 cycles (94°C pendant 30s, 55°C pendant 30s et 72°C pendant 1 min), enfin une extension finale à 72°C pendant 10min. L'amplification de l'ADN (PCR) a été réalisée dans les mêmes conditions que celle de l'ARN, à l'exception de l'étape de chauffage à 50°C pendant 30min qui n'existe pas dans la PCR externe pour L'ADN. Après les PCR internes, les tailles des différents fragments obtenus ont été de 515pb (PR M), 805pb (TI M), 453pb (PR O) et 798pb (TI O).

Concernant les PCR et RT-PCR ciblant la région codant pour l'intégrase, spécifique aux groupes VIH-1/M et O, la technique employée a été celle décrite par Heyndrickx *et al.* (1998). C'est une (RT-) PCR nichée dont la première étape, externe, adopte un même couple d'amorces spécifique aux groupes M et O. La PCR interne, quant à elle, a été effectuée avec deux couples d'amorces spécifiques à chacun des groupes. Le profil thermique des RT-PCR a été successivement de 50°C pendant 30min, 94°C pendant 2min et 35 cycles (94°C pendant 15s, 50°C pendant 30s et 72°C pendant 30s), enfin une extension finale à 72°C pendant 10min. La PCR interne, quant à elle, a été réalisée à 94°C pendant 15s, 25 cycles (94°C pendant 30s, 50°C pendant 30s et 72°C pendant 30s), enfin une extension finale à 72°C pendant 10min. Les PCR internes et externes ont suivi le profil thermique : 94°C pendant 15s, 35 cycles (94°C pendant 30s, 50°C pendant 30s et 72°C pendant 30s). Après les amplifications internes, les tailles des différents fragments obtenus ont été de 239pb (intégrase M) et 192pb (intégrase O) (Heyndrickx *et al.*, 1998).

Les PCR et (RT)-PCR des groupes VIH-1 (M et O), qui ciblent la région Gp41 de l'enveloppe virale, ont été réalisées comme décrit par Dachraoui *et al.* (2008), et Vessière *et al.* (2010). Ces PCR utilisent deux couples d'amorces spécifiques des groupes M et O et des programmes d'amplification identiques à ceux des PCR PR et TI décrits plus haut. Après les amplifications internes, les tailles des différents fragments obtenus ont été de 656pb (gp41 M) et 675pb (gp41 O) (Dachraoui *et al.*, 2008; Vessiere *et al.*, 2010b).

➤ PCR spécifique du variant N

Du fait d'une probable réactivité croisée entre le VIH-1/M et les peptides N, la confirmation de celles obtenues avec le peptide N a été faite avec un protocole « maison » des RT-PCRs nichées dites « non spécifiques » de Yang *et al.* (2000). Ces analyses ciblent respectivement une portion de la région intégrase de la polymérase et de la gp41 de l'enveloppe. Les amorces utilisées (Annexe 2) permettent l'amplification des différents types et groupes de VIH, ainsi que des SIVcpz et SIVgor. Pour les RT-PCRs externes, 10µL d'extrait d'ARN ont été ajoutés à 40 µL de RT-PCR Mix contenant : 10,6µL d'eau *RNase/DNase free*, 25µL de tampon 2X, 0,4µL de dNTPs (10mM), 1µL de *RNaseOUT*, 1µL de *SuperScriptIII One-Step RT-PCR Platinum Taq* (1UI/µL) et 1µL des amorces GP40F1 (20nM) et GP41R1 (20nM) pour la région Gp41 ou 1µL de l'amorce POLM 4150 (20nM) et POLORB (20nM) pour la région intégrase. Le mélange réactionnel obtenu, d'un volume de 50µL, a été placé dans un thermocycleur GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem) préprogrammé successivement à 50°C pendant 30min, 94°C pendant 5min et 35 cycles (94°C pendant 15s, 45°C pendant 30s et 68°C pendant 1min), enfin une extension finale à 68°C pendant 7min. Dans le but d'optimiser la sensibilité et la spécificité de la réaction, une PCR nichée (interne) a été réalisée avec les produits de chacune des RT-PCRs externes obtenus. Tour à tour pour chacune des PCRs internes réalisées, 2µL d'amplicons des RT-PCRs correspondantes ont été ajoutés à 48µL de PCR-Mix contenant : 37,5µL d'eau *RNase/DNase free*, 5µL de tampon 10X, 1µL de dNTPs (10mM), 2µL de MgCL₂ (50mM), 0,5µL de Taq polymérase (5UI/µL) et 1µL des amorces GP46F2 (20nM) et GP48R2 (20nM) pour la région gp41 ou 1µL des amorces POLM (20nM), POLR2 (20nM) et UNIPOL2B (20nM) pour la région intégrase. Le mélange réactionnel obtenu, d'un volume de 50µL, a été placé dans un thermocycleur GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem) préprogrammé successivement à 94°C pendant 5min, 35 cycles (94°C pendant 30s, 50°C pendant 30s et 72°C pendant 1min), et pour une extension finale à 72°C pendant 7min.

La taille des produits amplifiés à la fin des PCRs internes a été de 600pb pour l'intégrase et 800pb pour la gp41 (Yang *et al.*, 2000). Tous les fragments amplifiés ont été séquencés et ont subi des analyses phylogénétiques pour confirmer ou infirmer la présence d'un VIH-1/N.

➤ PCR spécifique avec VIH-2

Les échantillons qui se sont révélés positifs pour les peptides VIH-2 ont été analysés par des RT-PCRs nichées ciblant deux régions (PR et TI) du gène de la polymérase et qui serviront des couples d'amorces internes et externes spécifiques du VIH-2 (Annexe 3). Le profil thermique de la RT-PCR externe a été tour à tour : 50°C pendant 30min, 94°C pendant 2min, 35 cycles (94°C pendant 30s, 55°C pendant 30s et 68°C pendant 1min30s), et finalement une extension finale à 68°C pendant 7min. Le profil thermique utilisé en PCR interne a été le suivant : 94°C pendant 15min suivi de 35 cycles (94°C pendant 30s, 55°C pendant 30s et 72°C pendant 1min 30s), et une extension finale à 72°C pendant 7min. La taille des produits obtenus après amplification interne a été de 533pb pour la protéase et 969pb pour la transcriptase inverse.

II.3.2.3. Révélation des produits amplifiés par électrophorèse sur gel d'agarose

Le contrôle d'amplification des différentes (RT-) PCRs a été réalisé par une migration électrophorétique des amplicons sur un gel d'agarose à 1,5% contenant du GelGreen Nucleic Acid Gel Stain (Biotum Inc., Landing Parkway Fremont, California, USA) ; c'est un colorant fluorescent vert non cancérigène. Les tampons tris-borate-EDTA (TBE, 1X) ou tris-acétate-EDTA (TAE, 1X) ont servi à la préparation du gel. Le marqueur de poids moléculaires, 100bp DNA ladder (Invitrogen) a permis de vérifier la taille des produits obtenus lors de la révélation sur un transilluminateur UV Master Technology (Vilber Lormat, Marne la vallée, France).

Après révélation des amplicons des différentes PCRs et RT-PCRs, tous les produits positifs obtenus par révélation sur gel d'agarose ont été séquencés pour des analyses phylogénétiques.

II.3.2.4. Séquençage et analyses phylogénétiques

Les séquences obtenues des amplicons positifs ont par la suite été comparées aux séquences de référence ; cette caractérisation phylogénétique a permis ou non une confirmation moléculaire des résultats obtenus en sérotypie.

➤ Séquençage

Cette technique est référée à la méthode de terminaison de chaîne dite de Sanger (Sanger *et al.*, 1977).

- Purification des amplicons de (RT-) PCR

Tous les amplicons ont été purifiés à l'aide du kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Machery-Nagel, Düren, Allemagne) suivant les recommandations du fabricant. Deux volumes du tampon NTI sont ajoutés à un volume d'échantillon et le mélange est transféré sur des colonnes puis centrifugé à 11000g pendant 1min. Le lavage est ensuite fait par ajout de 650µL du tampon NT3 ; il est suivi de deux centrifugations successives à 11000g pendant 1min et 2min. Enfin, l'élution est réalisée par un ajout de 35 à 100µL du tampon d'élution NE suivi d'une centrifugation à 11000g pendant 1min. L'éluat obtenu est utilisé pour le séquençage.

- Réaction de séquençage

Le séquençage a été réalisé à l'aide du kit *GenomeLab DTCS-Quick Start* (Beckman Coulter, Galway, Ireland) après purification des produits de PCR. Les amorces utilisées sont celles des différentes PCR internes (Annexe 1, 2 et 3). Pour le séquençage, 11µL d'eau, 4µL de mix (*DTCS Quick Start Mix*), 3µL d'amorce à 1,6µM et 2µL d'ADN purifiés, sont distribués dans les puits d'une plaque de 96 puits. Ensuite, l'amplification est faite successivement à 30 cycles (96°C pendant 25s, 50°C pendant 25s et 60°C pendant 4min) sur un thermocycleur GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem).

- Précipitation à l'éthanol

Après réalisation de la PCR de séquençage, les amplicons obtenus ont été précipités avec de l'éthanol à froid. Pour cela, 5µL de solution stop (eau + acétate de sodium + EDTA + glycogène) et 60µL de solution d'éthanol 95% froid sont distribués dans chaque puits de la plaque. Le mélange est ensuite vortexé puis centrifugé. Après élimination du surnageant, les culots d'ADN sont lavés deux fois à l'aide de l'éthanol froid à 70% puis re-suspendus dans 40µL de SLS « *sample loading solution* ». C'est ce nouveau mélange qui est utilisé pour la révélation des séquences par migration électrophorétique sur le séquenceur automatique.

- Révélation de séquences

La révélation des séquences est faite avec les produits issus de la précipitation à l'éthanol qui sont ensuite séparés grâce à une migration par électrophorèse capillaire sur le séquenceur automatique CEQ 8000 (Beckman Coulter, Galway, Ireland).

➤ Analyses phylogénétiques

Les séquences obtenues après le séquençage ont été corrigées manuellement (afin d'éliminer des erreurs de séquençage) puis converties en acides aminés. L'alignement de ces séquences avec différentes séquences provenant de certaines souches de référence, représentatives des groupes de VIH-1 (M, O et N) ainsi que du type VH1-2, sélectionnées dans la base de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov>), a été réalisé grâce au logiciel MEGA 6.06

(Tamura *et al.*, 2013). Ce logiciel utilise l'algorithme d'alignement multiple de Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) avec quelques ajustements manuels, lorsque cela est nécessaire.

Les liens entre nos séquences et celles de référence ont été déterminés par la construction d'arbres phylogénétiques à l'aide du logiciel MEGA 6.06. La méthode du plus proche voisin ou « *neighbor-joining* » a été utilisée avec le modèle de Kimura à 2 paramètres pour le calcul des distances génétiques (Kimura, 1980; Saitou *et al.*, 1987). L'évaluation de la robustesse des topologies de nos arbres a été faite par le test de « bootstrap » avec 1000 ré-échantillonnages. Le seuil de significativité considéré dans ce travail est de 70%.

Cette analyse phylogénétique a permis d'identifier (1) les sous-groupes de variants non M, (2) les doubles infections M+O d'une part et, d'autre part, d'établir un lien éventuel entre les séquences de ces doubles infections et celles des recombinants déjà décrits dans la littérature.

La figure 17 résume le schéma des manipulations réalisées sur les échantillons recueillis sur les deux sous-populations étudiées (plasma de la routine au CPC et DBS de l'enquête démographique de santé) pour le dépistage du VIH et la caractérisation des variants VIH non M obtenus.

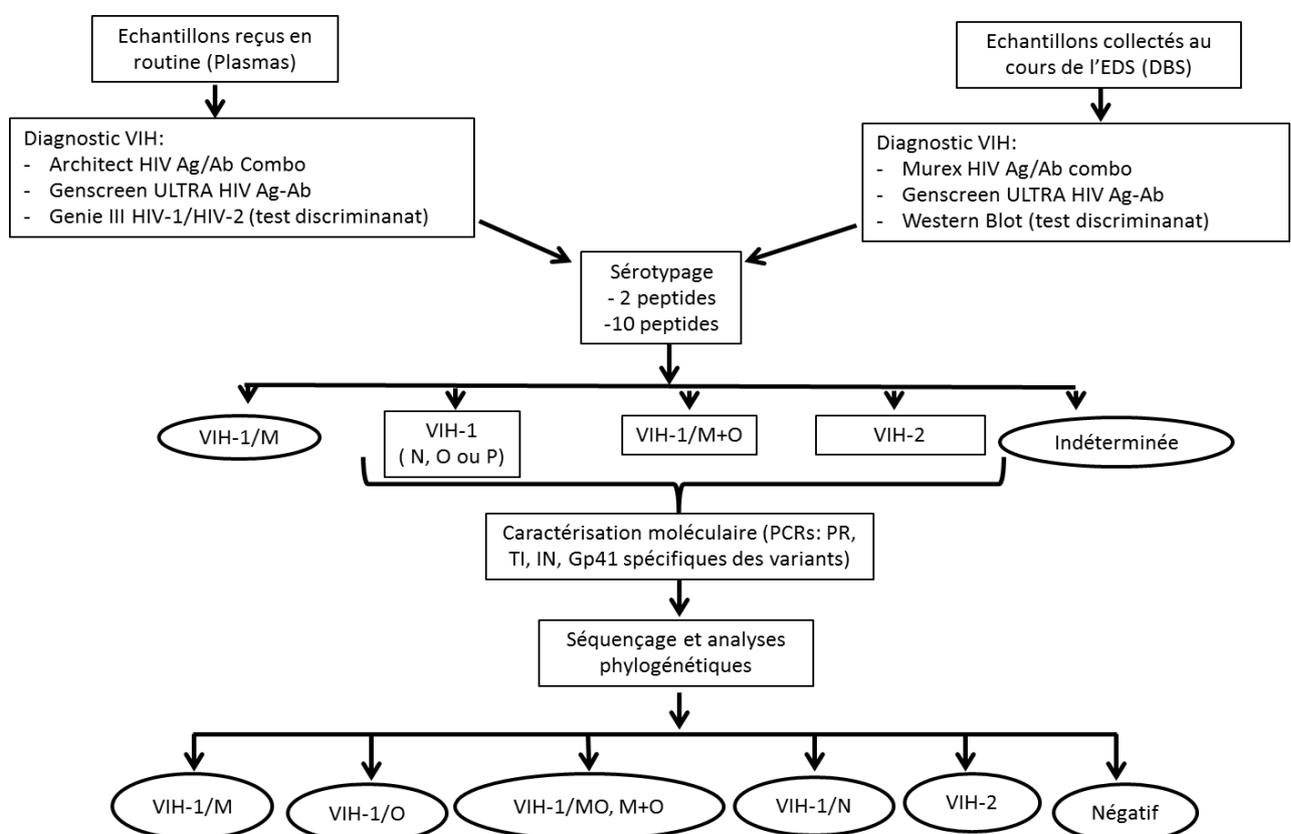


Figure 17 : Algorithme simplifié des analyses faites sur les deux types d'échantillons d'étudiés

II.3.3. Réalisation des tests génotypiques de résistance du VIH aux ARVs

Pour déterminer les résistances circulant chez les patients en échecs de traitement reçus au CPC et les DBS de l'EDS, le test génotypique de résistance a été réalisé sur les échantillons de nos deux sous-populations d'étude. Cette analyse consiste à amplifier les particules virales par RT-PCR ou PCR nichée après une extraction des acides nucléiques viraux. Les amplicons obtenus sont ensuite séquencés ; et leur interprétation à l'aide de l'algorithme de l'Agence National de recherche sur le VIH et les hépatites virales (ANRS) renseigner sur les mutations de résistances (ANRS, 2015).

II.3.3.1. Amplification des régions du génome viral

Les régions d'intérêt pour le test de résistance sont celles de la protéase et de la transcriptase inverse du gène polymérase. Ces deux régions sont ciblées par les AVRs administrés lors du traitement des personnes vivant avec le VIH jusqu'en 2016 au Cameroun.

➤ Extraction de l'ARN ou de l'ADN virale

Les extraits de l'ARN ou de l'ADN ont été obtenus en fonction des produits biologiques de départ (plasmas ou DBS). Le plasma des échantillons de routine a permis d'extraire l'ARN alors que les DBS des échantillons positifs au VIH de l'EDS ont servi à extraire l'ADN. L'extraction de ces acides nucléiques les sépare des autres constituants du produit biologique par chromatographie échangeuse d'ions. Les procédures d'extraction sont les mêmes que celles décrites avec le kit QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) pour l'extraction de l'ARN, et le kit QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) pour l'extraction de l'ADN.

➤ Réalisation des PCRs

Les protocoles d'amplification utilisés pour ces analyses sont d'une part celui de Yang *et al.* (2000) adopté par le groupe AC11 de l'Agence Nationale de Recherche sur le VIH/SIDA et les hépatites virales (ANRS) pour les VIH-1/M et, d'autre part celui de Vessière *et al.* (2010b) du Centre National de Recherche (CNR) pour VIH-1/O du CHU de Rouen.

A partir de l'ARN extrait, des RT-PCRs nichées ciblant la PR et la TI du génome viral et spécifiques de groupe M ou O du VIH-1 ont été réalisées sur les échantillons de routine en fonction de leur génotype. Concernant les DBS positifs au VIH de l'EDS, l'ADN viral a été utilisé pour les PCRs nichées. Les (RT-) PCRs externes ont été effectuées comme décrit plus haut (cf : II.3.2.2.; page 70) avec le kit « *Superscript III One-Step RT-PCR Platinum Taq HIFI* »

(Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad-Californie), tandis que le coffret « *HotStar Taq Master Mix* » (Qiagen) a été utilisé pour les PCRs externes et internes. Le volume final du mélange réactionnel dans tous les essais d'amplification a été de 50µl, soit 40µl de PCR-mix et 10µl d'extrait ARN ou ADN pour la première (RT-) PCR externe, soit 48µl de PCR-mix et 2µL de produit de première PCR ou RT-PCR pour la PCR interne. Un thermocycleur GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem) a servi aux différentes amplifications. Le profil thermique a été spécifique des différentes (RT-) PCRs réalisées et de chaque groupe de VIH-1 (M ou O) correspondant à l'échantillon analysé.

➤ Révélation par électrophorèse

Après amplification des acides nucléiques viraux, les produits de PCR obtenus ont été révélés sur un gel d'agarose pour la confirmation des amplifications positives. Cette technique consiste en une traditionnelle séparation des différents produits amplifiés en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel d'agarose comme décrit plus haut (cf : II.3.2.3. ; page 73).

II.3.3.2. Séquençage et interprétation des résistances

➤ Séquençage

Le séquençage des produits de PCR obtenus a été réalisé comme référé à la méthode de terminaison de chaîne de Sanger (Nicklen et Coulson, (1977)) suivant les différentes étapes décrites plus haut (cf : II.3.2.4. ; page 73). Tout d'abord une purification des produits de PCR a été réalisée, suivie d'un séquençage, de la précipitation avec l'éthanol à froid et une électrophorèse capillaire sur un séquenceur automatique a permis la révélation des séquences obtenues.

➤ Recherche des mutations de résistance

Afin d'éviter les erreurs pouvant favoriser l'apparition des mutations liées au séquençage, après ce dernier les séquences obtenues sont corrigées manuellement par comparaison des doubles brins (brin sens et anti-sens) à la séquence de référence HXB2 pour le VIH-1/M ou ANT70 pour le VIH-1/O. Les séquences consensus obtenues sont introduites dans le logiciel Greg+ (Greg+, 2015) pour l'analyse des mutations et l'interprétation des résistances. Greg+ est un logiciel libre qui utilise l'algorithme de l'ANRS pour l'interprétation des mutations. La version 26 de septembre 2016 (ANRS, 2016) est celle utilisée dans notre étude (Annexe 4). L'analyse des résistances a permis, par comparaison des séquences consensus obtenues à la séquence de référence HXB2 (FR.83.HXB2_LAI_IIIB_BRU.K03455),

d'identifier (1) grâce aux échantillons de routine les différentes résistances du VIH circulant au Cameroun chez les patients en échec de traitement du VIH aux ARVs, (2) grâce aux échantillons de DBS positifs au VIH collectés au cours de l'EDS les résistances du VIH circulant au Cameroun chez les patients naïfs au traitement du VIH aux ARVs.,

La figure 18 montre les différentes cibles des PCRs réalisées pour le test de résistance du VIH aux ARVs.

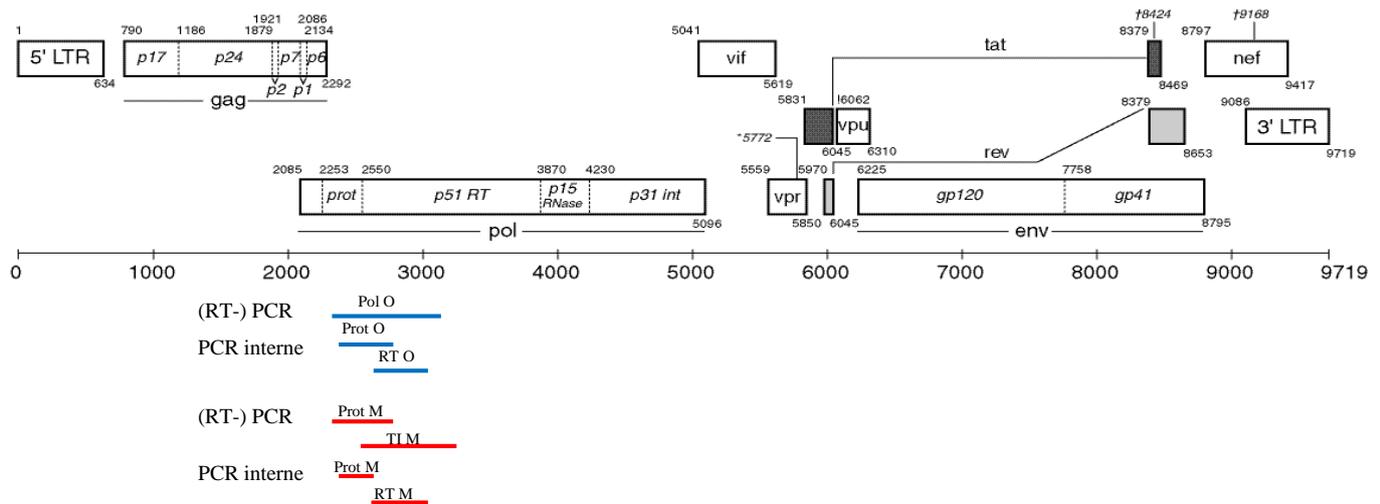


Figure 18 : Cibles des différentes (RT-) PCR pour le test de résistance du VIH aux ARVs

Source : <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/IMAGES/hxb2genome.gif> (Page consultée le 04/07/2018).

Les fragments amplifiés sont représentés en rouge pour la PCR spécifique VHI-1/M et en bleu pour le VIH-1/O.

pol= polymérase; Prot= Protéase; RT= Transcriptase Inverse; int= Intégrase et env= enveloppe. La taille des différents fragments obtenus après la PCR interne était de 515 pb (Port M), 805 pb (RT M), 453 pb (Port O), 798 pb (RT O). Les séquences des différentes amorces sont présentées dans l'annexe 1.

II.3.4. Analyses statistiques

Les données collectées pour l'étude de la diversité génétique du VIH et de la résistance de ce dernier aux ARVs ont été présentées en nombre et en pourcentages. Le test de khi-deux a permis l'analyse des variables qualitatives. Les rapports de côtes, encore appelés « *Odd ratio* », qui permettent d'identifier le risque associé à un paramètre quelconque, ont été déterminés par le modèle de régression logistique conditionnel pour l'observation de l'évolution avec le temps de certains variants de VIH. Les différentes proportions, obtenues ont été calculées avec un intervalle de confiance de 95%. Seuls les tests rendant des valeurs de $P < 0,05$ ont été considérés comme présentant des différences significatives. Toutes les analyses ont été effectuées à l'aide des logiciels SPSS 16.0 et R (version 3.2.2) pour Windows.



Chapitre III : Résultats

III.1. Détermination de la fréquence de détection des différents variants du VIH circulant au Cameroun

La détermination de la fréquence de détection des différents variants du VIH a été faite sur nos deux types d'échantillons à savoir ceux des patients reçus en routine au CPC pour un dépistage sérologique du VIH et ceux des DBS conclus VIH positifs au cours de l'EDS de 2011.

III.1.1. Echantillons reçus en routine au CPC

III.1.1.1. Dépistage sérologique du VIH

Le dépistage sérologique du VIH a été effectué sur une période de sept ans allant de janvier 2010 à décembre 2016 ; les résultats obtenus sont résumés dans le tableau II. Sur les sept ans, un total de 83253 échantillons de patients ont été reçus au Laboratoire de Virologie du CPC avec un maximum en 2010 (17268 échantillons; 20,7%) et un minimum en 2014 (9833 échantillons; 11,8%). Plus de femmes, 50157 soit 60,2%, ont été enregistrées comparativement aux hommes, 30135 soit 36,2%, pour cette analyse. Il a par ailleurs été observé que les dossiers de 2961 patients (3,6%) n'avaient pas de précision sur leur genre. L'âge médian est de 31 ans (IQR= 24-41 ans), l'âge minimum étant d'un jour et l'âge maximum de 130 ans. Des 83253 échantillons des patients reçus, 57552 (69,1%) ont eu un résultat sérologique VIH négatif, 24448 (29,4%) un résultat sérologique VIH positif et 1253 (1,5%) un résultat VIH indéterminé suivant l'algorithme de diagnostic utilisé. La répartition de ces résultats par année est détaillée dans le tableau II.

Tableau II: Résultats des sérologies VIH par catégorie

Caractéristiques des patients	Médiane (IQR)	Sérologie VIH [n ₁ (%)]			Nombre de patients par caractéristique n ₂ (%)
		Négative	Positive	Indéterminée	
Age des patients au jour du test (ans)	31(24-41)				
<15		3427 (71,7)	1173 (24,6)	177(3,7)	4777 (5,7)
15-50		46782 (69,9)	19267 (28,8)	915 (1,4)	66964 (80,4)
>50		6647 (64,9)	3458 (33,8)	140 (1,4)	10245 (12,3)
Données manquantes		696 (54,9)	550 (43,4)	21 (1,7)	1267 (1,5)
Genre					
Homme		21769 (72,2)	7880 (26,1)	486 (1,6)	30135 (36,2)
Femme		34087 (68,0)	15445 (30,8)	625(1,2)	50157 (60,2)
Données manquantes		1696 (57,3)	1123 (37,9)	142 (4,8)	2961 (3,6)
Année de l'étude					
2010		7988 (46,3)	9190 (53,2)	90 (0,5)	17268 (20,7)
2011		7946 (72,1)	2977 (27,0)	96 (0,9)	11019 (13,2)
2012		8595 (77,3)	2427 (21,8)	100 (0,9)	11122 (13,4)
2013		8650 (65,6)	4311 (32,7)	234 (1,8)	13195 (15,8)
2014		7564 (76,9)	2005 (20,5)	264 (2,7)	9833 (11,8)
2015		8548 (79,6)	1978 (18,4)	211 (2,0)	10737 (12,9)
2016		8261 (82,0)	1560 (15,5)	258 (2,6)	10079 (12,1)
Total		57552 (69,1)	24448 (29,4)	1253 (1,5)	83253 (100)

Le pourcentage des différents groupes des colonnes 3 à 5 est le ratio entre le nombre de patients (n₁) de chaque groupe X100 sur le nombre total de patients de la ligne concernée (n₂). Par contre les pourcentages de la dernière colonne sont le ratio entre le nombre de patients (n₂) X100 de chaque groupe sur le nombre total de patients N. IQR= intervalle interquartile.

Globalement, ces résultats obtenus sur les sept années d'étude montrent une diminution significative (P=0,001), avec le temps, du nombre de patients VIH positifs reçus au CPC, soit 53,2% (9190 sur 17268) en 2010 à 15,5% (1560 sur 10079) en 2016. On observe également une augmentation du taux de résultats sérologiques VIH indéterminés sur les sept ans, c'est-à-

dire de l'ordre de 0,5 % (90 sur 17268) en 2010 à 2,6% (258 sur 10079) en 2016. Le risque associé à la diminution du taux de patients VIH positifs reçus au CPC au fil du temps est consigné dans le tableau III.

Tableau III : Risque associé à la diminution du nombre de patients VIH positifs de 2010 à 2016

		Années d'étude						
		2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
OR	Référence		0,33	0,25	0,43	0,23	0,20	0,16
IC	/		0,31-0,34	0,23-0,26	0,41-0,45	0,22-0,24	0,19-0,21	0,15-0,17
p	/		0,001	0,001	0,001	0,005	0,005	0,001

OR, odd ratio; IC, intervalle de confiance.

Les valeurs OR montrent bien une forte association entre les années d'étude et les taux de positivité sérologique. Ce qui confirme la diminution significative du taux de patients VIH positif entre 2010 et 2016.

III.1.1.2. Sérotypage des échantillons de VIH positifs

Le sérotypage du VIH a été réalisé sur tous les 24448 échantillons de patients VIH positifs obtenus sur les sept années ; parmi eux 24079 (98,5%) ont été mono-réactifs au VIH-1/M, 119 (0,5%) mono-réactifs au VIH-1/O, alors que 70 ont présenté une double réactivité au VIH-1/M+O (0,3%). Une réactivité au VIH-1/N a été observée pour un seul échantillon (0,004%). Aucun échantillon n'a été réactif avec le peptide correspondant au VIH-1/P. Le VIH-2 quant à lui a été identifié chez 8 patients (0,03%) ; enfin 171 échantillons (0,7%) ont été négatifs avec tous les peptides utilisés et rassemblés dans la catégorie sérotype indéterminé. Le tableau IV résume les résultats obtenus.

Tableau IV: Répartition des différents variants VIH par année

Années	Variants VIH [n ₁ (%)]						Total patients n ₂ par année (%)
	VIH-1				VIH-2	Sérotype indéterminé	
	M	O	N	M+O			
2010	9105 (99,1)	23 (0,3)	0 (0,0)	7 (0,1)	1 (0,0)	54 (0,6)	9190 (37,6)
2011	2880 (96,7)	20 (0,7)	0 (0,0)	2 (0,1)	0 (0,0)	75 (2,5)	2977 (12,2)
2012	2404 (99,1)	17 (0,7)	0 (0,0)	4 (0,2)	1 (0,0)	1 (0,0)	2427 (9,9)
2013	4279 (99,3)	20 (0,5)	0 (0,0)	10 (0,2)	2 (0,0)	0 (0,0)	4311 (17,6)
2014	1984 (99,0)	13 (0,6)	1 (0,0)	6 (0,3)	1 (0,0)	0 (0,0)	2005 (8,2)
2015	1933 (97,7)	13 (0,7)	0 (0,0)	8 (0,4)	2 (0,1)	22 (1,1)	1978 (8,2)
2016	1494 (95,8)	13 (0,8)	0 (0,0)	33 (2,1)	1 (0,1)	19 (1,2)	1560 (6,4)
Total	24079 (98,5)	119 (0,5)	1 (0,0)	70 (0,3)	8 (0,0)	171 (0,7)	24448 (100)

Le pourcentage des différents variants des colonnes 2 à 7 est le ratio entre le nombre de patients (n₁) de chaque groupe X100 sur le nombre total de patients (n₂) de la ligne concernée. Par contre les pourcentages de la dernière colonne sont le rapport entre le nombre de patients (n₂) de chaque groupe X100 sur le nombre total N= 24448 patients.

Le tableau IV montre que le variant VIH-1/M a été majoritaire (98,5%) alors que et le VIH-2 est resté rare (0,03%) dans la population pendant les sept années d'étude. Les analyses ont aussi rendu 0,7% de sérotypes indéterminés. Sur les 7ans de cette étude, nous observons une augmentation significative (P=0,001) du taux de patients VIH-1/M+O soit 0,1% (7 sur 9190) en 2010 à 2,1% (33 sur 1560) en 2016. Le risque associé à l'augmentation du taux de patients VIH-1/M+O au fil du temps est consigné dans le tableau V

Tableau V : Risque associé au nombre des doubles réactivités M+O avec le temps

		Années d'étude						
		2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
OR	Référence		0,9	2,2	3,1	3,9	5,3	28,3
IC	/		0,13-3,6	0,57-7,2	1,17-8,4	1,27-11,8	1,9-15,21	13,3-69,9
p	/		0,8	0,2	0,02	0,01	0,001	0,001

OR, odd ratio; IC, intervalle de confiance.

Ce risque est significativement accentué ou multiplié par environ quatre à partir de 2014.

III.1.2. Echantillons de DBS collectés au cours de l'EDS 2011

III.1.2.1. Caractéristique de la population d'étude

Pour la détermination de la prévalence des différents variants du VIH circulant dans la population générale camerounaise a été menée sur les échantillons de DBS positifs au VIH, collectés au cours de l'EDS 2011, soit environ 14700 prélèvements de sang séché. Ils ont été

obtenus des femmes âgés de 15 à 49 ans et hommes âgés de 18 à 59 ans. Après analyse, 673 prélèvements ont été révélés VIH positifs, ce qui donne un taux de prévalence du VIH de 4,3% en 2011 au Cameroun. Il est apparu que, plus de femmes étaient infectées (5,6%) comparées aux hommes (2,9%). Les régions les plus touchées étaient le Sud (7,2%), l'Est (6,3%) et le Nord-ouest (6,3%) ; la tranche d'âge la plus affectée a été celle de 25 à 29 ans. Les personnes infectées vivaient aussi bien en zone rurale (318 sur 673 ; 47,3%) qu'urbaine (330 sur 673 ; 49%).

III.1.2.2. Sérotypage des DBS VIH positifs de l'EDS

Tous les échantillons conclus positifs au VIH au cours du dépistage des 673 échantillons d'EDS ont été sérotypés. Parmi eux, 646 ont eu une mono-réactivité avec les peptides VIH-1/M, 4 une mono-réactivité avec les peptides VIH-1/O et 23 autres ont été conclus de sérotype indéterminé. Aucune réactivité n'a été observée pour les VIH-1/N, VIH-1/P et VIH-2 ; aucune double réactivité n'a également été observé (tableau VI).

Tableau VI : Répartition des différents variants de VIH en fonction des régions (villes) du Cameroun

Régions (Villes)	Variants du VIH n ₁ (%)						Total patients examinés n ₂ (%)
	VIH-1				VIH-2	Sérotype indéterminé	
	M	O	N	M+O			
Adamaoua	55 (96,5)	1 (1,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,8)	57 (8,5)
Centre (Douala)	66 (97,1)	1 (1,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,5)	68 (10,1)
Est	57(98,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,7)	58 (8,6)
Extrême-Nord	59 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	59 (8,8)
Littoral	19 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	19 (2,8)
Nord	34 (91,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (13,0)	37 (5,5)
Nord-Ouest	36 (94,7)	1 (2,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (2,6)	38 (5,6)
Ouest	82 (95,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (4,7)	86 (12,8)
Sud	33 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	33 (4,9)
Sud-Ouest (Yaoundé)	57 (91,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	5 (8,1)	62 (9,2)
Pas d'info	60 (95,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (4,8)	63 (9,4)
	66 (97,1)	1 (1,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,5)	68 (10,1)
	22 (88,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (12,0)	25 (3,7)
Total	646 (96,0)	4 (0,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	23 (3,4)	673 (100)

Le pourcentage des différents variants des colonnes 2 à 7, est le ratio entre le nombre de patients (n_1) de chaque groupe X100 sur le nombre total de patients (n_2) de la ligne concernée. Par contre les pourcentages de la dernière colonne, sont le ratio entre le nombre de patients (n_2) de chaque groupe X100 sur le nombre total $N=24448$.

Le tableau VI montre une prédominance du VIH-1/M dans toutes les régions du Cameroun. Les quatre patients diagnostiqués VIH-1/O provenaient un de l'Adamaoua, un du Nord et deux du Centre dont l'un de Yaoundé.

III.2. Caractérisation moléculaire des variants non VIH-1/M détectés

Dans cette section, tous les échantillons positifs de sérotype VIH-1 non M et VIH-2 des deux sous-populations d'étude, soit 202 échantillons (198 échantillons de routine et 4 échantillons de l'EDS), ont été caractérisés dans quatre régions du génome viral à savoir PR, TI, IN du gène polymérase et gp41 du gène enveloppe.

III.2.1. Cas des échantillons de routine reçus au CPC

Globalement, 190 VIH-1 non M dont 119 (62,6%) mono-réactifs au VIH-1/O, 70 (36,8%) double réactifs au VIH-1/M+O, 1 (0,5%) mono-réactif au VIH-1/N et 8 (4,2%) VIH-2 obtenus en sérotypie ont subi des (RT-) PCRs spécifiques.

III.2.1.1. Variants VIH-1/O et les doubles réactivités VIH-1/M+O

De 2010 à 2016, le sérotypage a montré que 119 sur 189 (63%) échantillons des patients reçus ont été réactifs avec le peptide VIH-1/O et les 70 (37%) autres avec le VIH-1/M+O. Cependant, à cause des problèmes de volume insuffisant de certains de ces échantillons, seuls 40 (21,2%), soit 30 échantillons VIH-1/O et 10 échantillons VIH-1/M+O ont été caractérisés. Des (RT-) PCRs spécifiques des groupes VIH-1 M et O ont été réalisées dans quatre des régions du génome viral suscitées et les résultats sont résumés dans le tableau VII ci-dessous.

Tableau VII : Récapitulatif des résultats obtenus avec les RT-PCRs VIH-1/M et VIH-1/O, sur échantillons dans les deux gènes en fonction des résultats du sérotypage

Profil moléculaire ^a (conclusion)	Types de réactivités en sérotypie		Total N=40
	Mono-réactivité O n ₁ = 30	Double réactivité M+O n ₂ = 10	
<i>pol</i> M/ <i>env</i> M ^b (VIH-1/M)		6	6
<i>pol</i> O/ <i>env</i> O ^c (VIH-1/O)	26	2	28
Positif uniquement en VIH-1/O dans une seule région ^d (VIH-1/O)	3		3
<i>pol</i> M ou O/ <i>env</i> O ^e (VIH-1/MO)	1		1
<i>pol</i> M/ <i>env</i> M+O ^f (VIH-1/MO associé à un virus parental)		1	1
<i>pol</i> M+O/ <i>env</i> M+O ^g (VIH-1/M+O)		1	1

pol : polymérase ; *env*: enveloppe PR : protéase ; TI : transcriptase inverse ; Gp41 : glycoprotéine 41 ; IN : Intégrase.

a : résultats obtenus sur le gène de la polymérase et de l'enveloppe après révélation sur gel des produits viraux amplifiés avec des RT-PCR VIH-1/M et VIH-1/O.

b : les RT-PCRs effectuées étaient positives pour le VIH-1/M uniquement dans les quatre régions PR, TI, IN (*pol*) et gp41 (*env*).

c : RT-PCRs positives pour le VIH-1/O uniquement dans les quatre régions PR, TI, IN (*pol*) et gp41 (*env*).

d : RT-PCRs positives pour le VIH-1/O dans la région IN (*pol*) uniquement, et négatifs à la fois pour le VIH-1/M et le VIH-1/O dans les autres régions.

e : RT-PCRs positives pour le VIH-1/M uniquement dans deux régions PR et IN (*Pol*), et pour le VIH-1/O dans la TI (*Pol*) et la gp41 (*env*).

f : RT-PCRs positives uniquement pour le VIH-1/M dans trois régions PR, TI, IN (*pol*) et positifs à la fois pour le VIH-1/M et le VIH-1/O en Gp41 (*env*).

g : les RT-PCRs étaient positives à la fois pour le VIH-1/M et le VIH-1/O dans les quatre régions (PR, TI, IN et gp41).

En résumé, il ressort de ce tableau que parmi les 30 échantillons mono-réactifs au VIH-1/O en sérotypie, les RT-PCRs ont été positives uniquement pour le VIH-1/O dans les quatre régions ciblées pour 26 (93,4%) d'entre eux, profil en faveur d'une mono-infection VIH-1/O. Pour trois échantillons (3,3%), les RT-PCRs ont été positives uniquement pour le VIH-1/O dans la région intégrase et négatives dans les autres régions pour le VIH-1/M et VIH-1/O. Ces échantillons ont été considérés comme mono-infectés au VIH-1/O. Chez le dernier échantillon de cette série (3,3%), des résultats discordants dans les gènes *pol* et *env* ont été obtenus; seuls les RT-PCRs ciblant le VIH-1/M dans les régions protéase et intégrase de la polymérase ont été positives, tandis que les RT-PCRs spécifiques du groupe O ont été positives dans la région

transcriptase inverse de la polymérase et la région gp41 du gène enveloppe. Ces résultats suggèrent la présence d'un virus recombinant VIH-1/MO chez ce patient.

S'agissant des 10 échantillons qui ont présenté une double réactivité M+O en sérotypie, 6 (60%) et 2 (20%) d'entre eux ont obtenu des résultats de RT-PCRs positives dans les quatre régions ciblées pour le VIH-1/M et VIH-1/O respectivement ; ce profil est en faveur d'une mono-infection par VIH-1/M ou VIH-1/O. Chez un échantillon (10%), les résultats de RT-PCRs ont été positifs pour le VIH-1/M dans les trois régions du gène *pol*, tandis que dans la gp41 du gène *env*, les RT-PCRs ont été positives pour les VIH-1/M et VIH-1/O. Ces résultats sont en faveur de la présence d'au moins deux virus chez ce patient, chez lesquels il y a une forme recombinante VIH-1/MO. Quant au dernier échantillon double réactif en sérotypie, les RT-PCRs réalisées ont été positives pour le VIH-1/M et le VIH-1/O dans toutes les régions amplifiées ; ceci indique la présence d'au moins deux virus chez ce patient et laisse penser à une double infection VIH-1/M+O.

Globalement, sur les 40 échantillons analysés, soit 30 mono-réactifs VIH-1/O et 10 double-réactifs VIH-1/M+O en sérotypie, la caractérisation moléculaire a mis en évidence quatre profils:

- un profil en faveur d'une mono infection chez 37 échantillons, soit 6 VIH-1/M (15%) et 31 VIH-1/O (77,5%);
- un profil en faveur d'un recombinant isolé VIH-1/MO retrouvé dans un échantillon (2,5%);
- un profil en faveur d'une double infection avec un recombinant VIH-1/MO associé à un virus parental retrouvé dans un échantillon (2,5%) ;
- enfin un profil en faveur d'une double infection VIH-1/M+O retrouvée dans un échantillon (2,5%).

➤ *Diversité génétique des VIH-1/O*

Du fait de la grande variabilité du gène *env*, les amplicons de gp41 obtenus chez 26 des 31 échantillons mono-infectés VIH-1/O ont été séquencés pour en déterminer les sous-groupes VIH-1/O et les éventuels liens phylogénétiques existant entre ces souches. Cinq (5) échantillons sur les 31 ont pu être amplifiés pour l'IN O ; cette région a permis les analyses phylogénétiques. La figure 19 présente les résultats obtenus. Les séquences de référence ont été choisies de manière à représenter la diversité génétique des VIH-1/O.

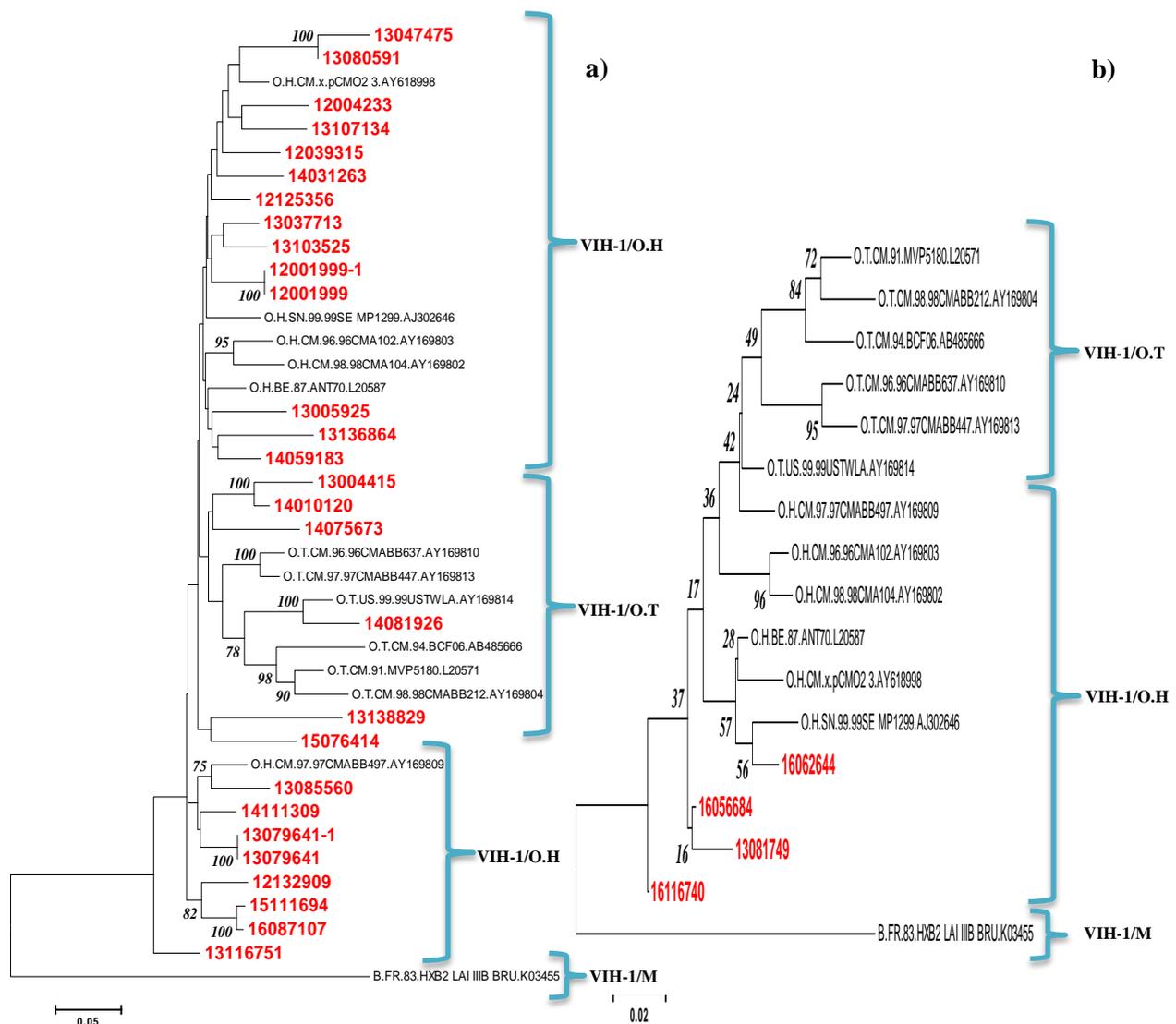


Figure 19 : Arbres phylogénétiques construits avec (a) le gène gp41 (415bp) et (b) le gène IN (100pb) des VIH-1/O.

Chaque séquence de référence (en noir) est associée à son numéro d'accèsion suivi du nom de la séquence. Les séquences de VIH-1/O que nous décrivons sont représentées en rouge sur les différents arbres. En utilisant la classification proposée par Leoz *et al*, 2015 les arbres phylogénétiques obtenus ont permis de classer les VIH-1/O en H et T.

Il ressort de la figure 19 que 25 (80%) des échantillons traités appartiennent aux sous-groupes VIH-1/O groupe H et 6 (20%) au sous-groupe T.

➤ *Bilan des analyses des doubles infections VIH-1/M+O et recombinants VIH-1/MO obtenus par PCRs*

Concernant tous les échantillons conclus doubles infectés en M et O par la PCR (3 échantillons), le tableau VIII récapitule les résultats obtenus dans les différentes PCRs réalisées.

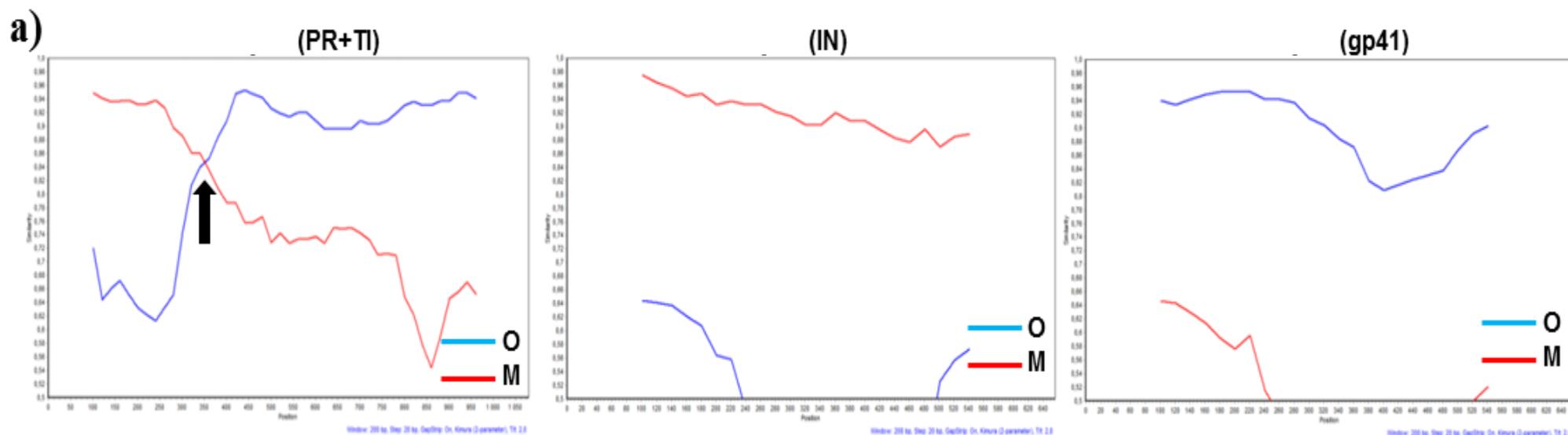
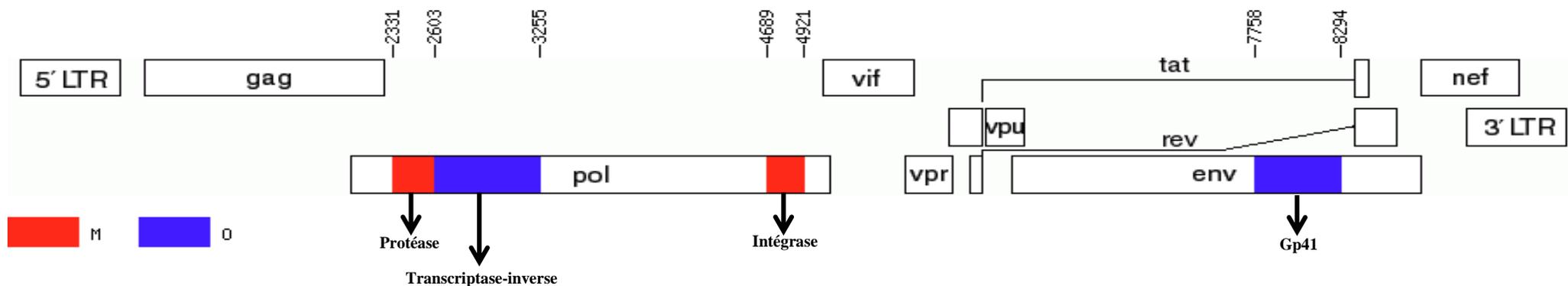
Tableau VIII: Détail des (RT-) PCR des échantillons à profil de double infection VIH/M+O ou recombinant VIH-1/MO

N° du Patient	Conclusion sérotypie	PCR M				PCR O				Conclusion moléculaire
		PR	TI	IN	Gp41	PR	TI	IN	Gp41	
1	VIH-1/O	+	-	+	-	-	+	-	+	VIH-1/MO
2	VIH-1/M+O	+	+	+	+	-	-	-	+	VIH-1/MO + parental VIH-1/M
3	VIH-1/M+O	+	+	+	+	+	+	+	+	VIH-1/M+O

- : négatif ; + : positif ; PR : protéase ; TI : transcriptase inverse ; Gp41 : glycoprotéine 41 ; IN : Intégrase.

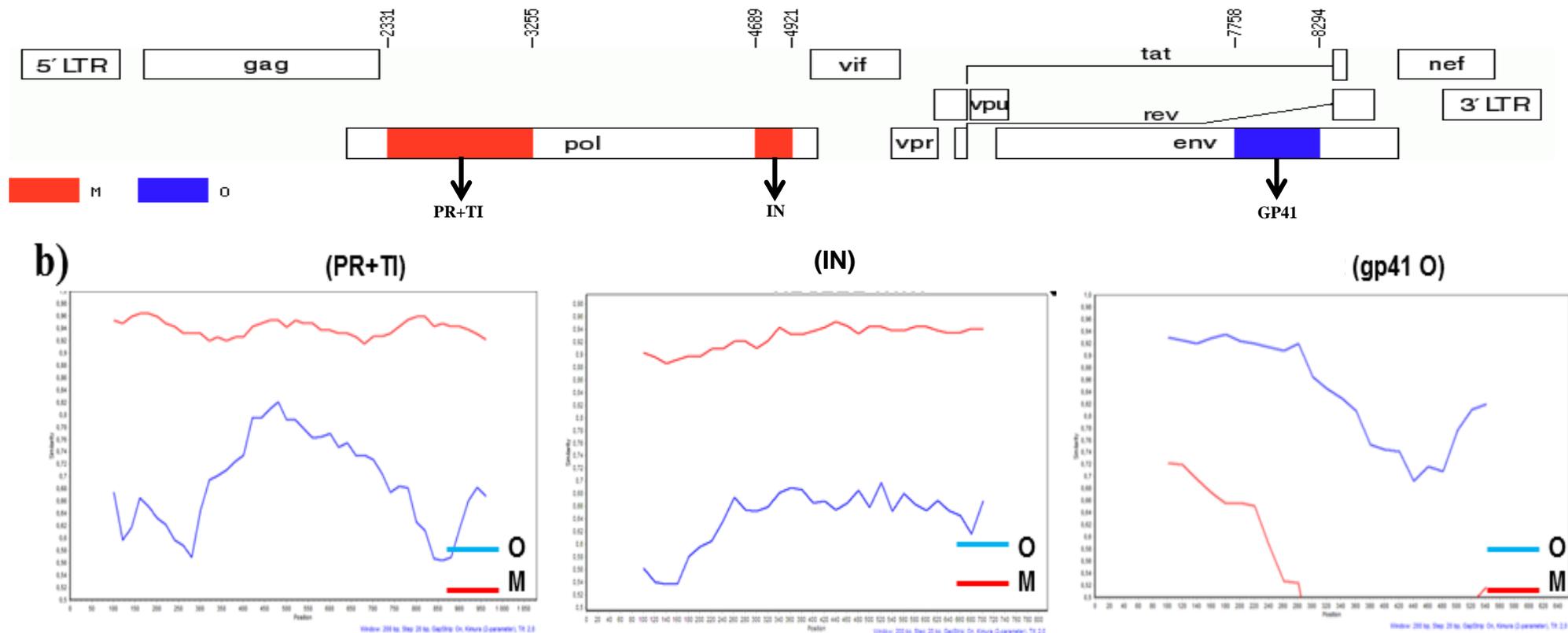
Les RT-PCRs réalisées avec les amorces spécifiques des groupes M et O ressortent 3 profils. Le premier profil est celui d'un recombinant VIH-1/MO « isolé » dont la PR et IN sont VIH-1/M, et la TI et gp41 VIH-1/O. Le deuxième profil est celui d'une coinfection d'un virus recombinant dont la *pol* (PR, TI et IN) est VIH-1/M et l'*env* (gp41) est VIH-1/O associé à une souche parental VIH-1/M. Enfin, le dernier profil quant à lui est celui d'une double infection VIH-1/M+O, avec toutes les RT-PCRs réalisées positives pour les deux groupe M et O.

L'analyse de similarité « *SimPlots* » a été réalisée afin de confirmer la présence du virus recombinant VIH-1/MO chez le premier échantillon, la localisation de certains points de recombinaison chez ce dernier le cas échéant, ainsi que la présence des deux variants M et O dans la gp41 dans le cas du deuxième échantillon (figure 20).



a) Analyse de similarité (Simplot) des séquences PR+TI, IN et gp41 de l'échantillon présentant un profil recombinaison VIH-1/MO.

Les séquences obtenues après séquençage des amplicons avec les (RT-) PCRs en PR, TR, IN et gp41, ont été comparées aux séquences de références représentatives de VIH-1/M sous-type CRF02_AG (en rouge), et du VIH-1/O sous-groupe H (O.BE.87.ANT70.L20587) (en bleu). Le changement « *switch* » de la séquence M vers O est indiqué par une flèche. L'axe des ordonnées représente le pourcentage de similarité entre nos séquences et les séquences de références. L'axe des abscisses quant à lui représente les différentes positions sur la séquence.



b) Analyse de similarité (Simplot) des séquences PR+TI et gp41 de l'échantillon présentant un profil de recombinaison VIH-1/MO associé à un parental.

Les séquences obtenues après séquençage des amplicons avec les (RT-) PCRs en PR, TR et gp41, ont été comparées aux séquences de références représentatives de VIH-1/M sous-type CRF02_AG (en rouge), et du VIH-1/O sous-groupe H (O.BE.87.ANT70.L20587) (en bleu). L'axe des ordonnées représente le pourcentage de similarité entre nos séquences et les séquences de références. L'axe des abscisses quant à lui représente les différentes positions sur la séquence.

Figure 20 : (a et b) Analyse de similarité (Simplot) des séquences PR+TI, IN et gp41 des deux échantillons présentant un profil recombinaison VIH-1/MO.

Dans les SimPlots ci-dessus, la figure (a) correspondant à l'échantillon N°1 met en évidence un point de recombinaison situé entre la PR et la TI ; ceci laisse penser que cet échantillon est un recombinant. L'analyse du génome complet de ce virus pourrait permettre de mettre en évidence d'autres points de recombinaison qui, d'après les résultats des différentes PCR réalisées, pourraient être entre la TI et l'IN de la *pol* et dans la *vpr*. La figure (b) représentant l'échantillon N°2 montre que ce dernier est proche des VIH-1/M en polymérase. Dans l'enveloppe, les séquences de gp41 M et O obtenues de cet échantillon sont proches pour l'une des VIH-1/M et pour l'autre des VIH-1/O ; ceci suggère la présence de deux virus chez cet individu. L'analyse du génome complet chez ce patient pourrait mettre en évidence la présence de deux virus parmi lesquelles : un recombinant VIH-1/MO ayant une *pol* M et une *env* O et un virus parental VIH-1/M. Ce résultat et le profil *pol/env* obtenu (tableau VIII) suggèrent que le point de cassure du recombinant serait situé en dehors du gène *vpr* ; toutefois ce résultat mérite d'être confirmé avec la réalisation du génome complet de cet échantillon.

III.2.1.2. Cas des variants VIH-1/N

Entre 2010 et 2016, un échantillon mono-réactif VIH-1/N a été obtenu en 2014 chez une patiente camerounaise de 43ans résidant dans la région du Centre. Les séquences des amplicons, obtenues des PCRs internes, des régions IN et gp41 ont permis de construire des arbres phylogénétiques avec 16 des 20 cas de VIH-1/N actuellement décrits dans le monde, des séquences de certains variants de VIH-1 M et O, et quelques souches de SIV_{CPZ} (figure 21).

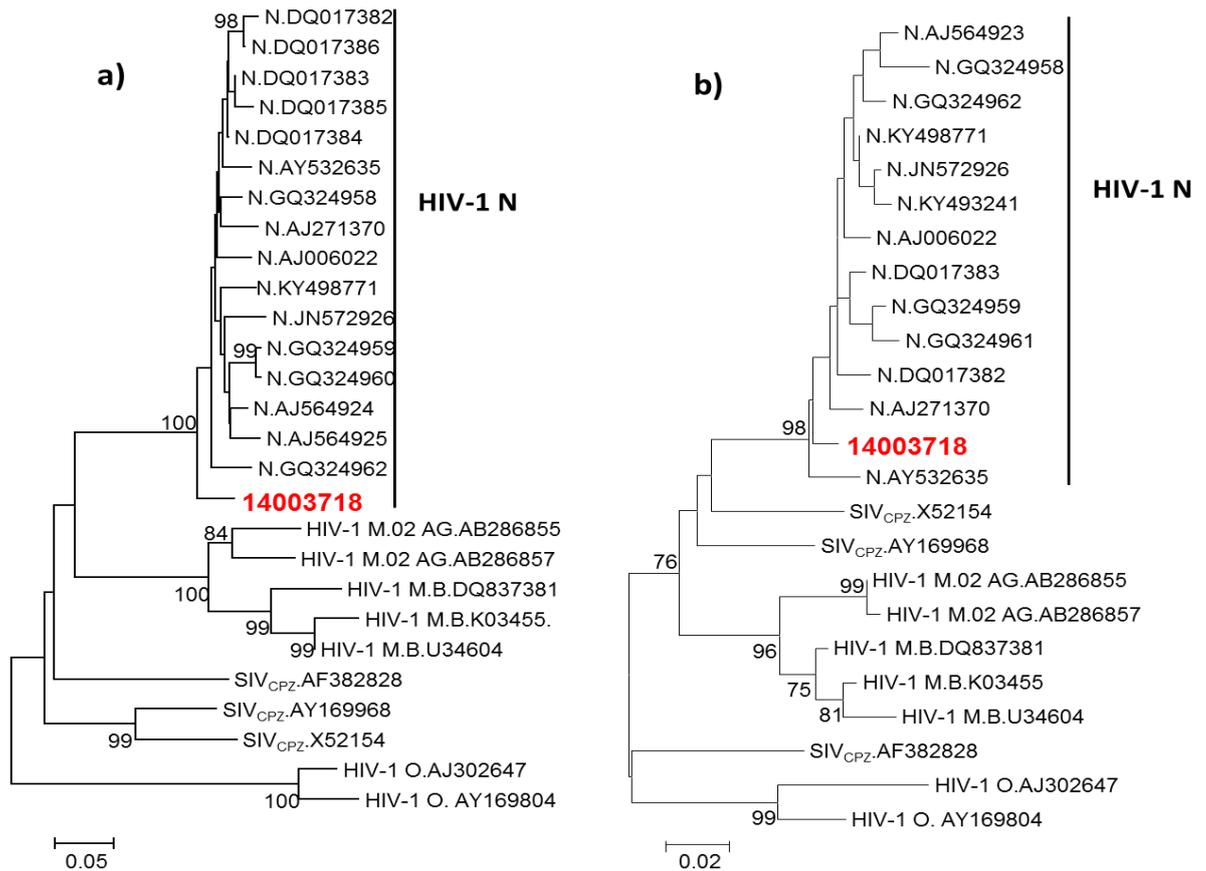


Figure 21 : Arbre phylogénétique à partir des régions (a) gp41 (415bp) et (b) IN (649bp) du VIH-1/N séquencées.

Chaque séquence de référence (en noir) est associée à son numéro d'accèsion accompagné du nom de la séquence. Le nouveau VIH-1/N que nous décrivons ici est représenté en rouge sur les différents arbres.

Ces arbres phylogénétiques montrent bien que les séquences de cet échantillon sont celles du VIH-1/N. Cette souche est bien distincte de celles de VIH-1/N décrites jusqu'à présent (figure 21 a et b).

III.2.1.3. Cas des variants VIH-2

Tous les échantillons réactifs avec les peptides du VIH-2 au sérotypage ont été caractérisés par des RT-PCR nichées ciblant les régions protéase et transcriptase inverse du gène de la polymérase. Au cours des sept années de la présente étude, 8 échantillons VIH-2 positifs (0,03%) ont été détectés en sérotypie ; ils provenaient tous des adultes de plus de 30 ans dont la plupart (75%) étaient des femmes. La moitié de ces échantillons a pu être amplifiée et l'arbre phylogénétique a été construit. Il est apparu que parmi les 4 échantillons positifs, 2 étaient des VIH-2/A et 2 des VIH-2/B (figure 22).

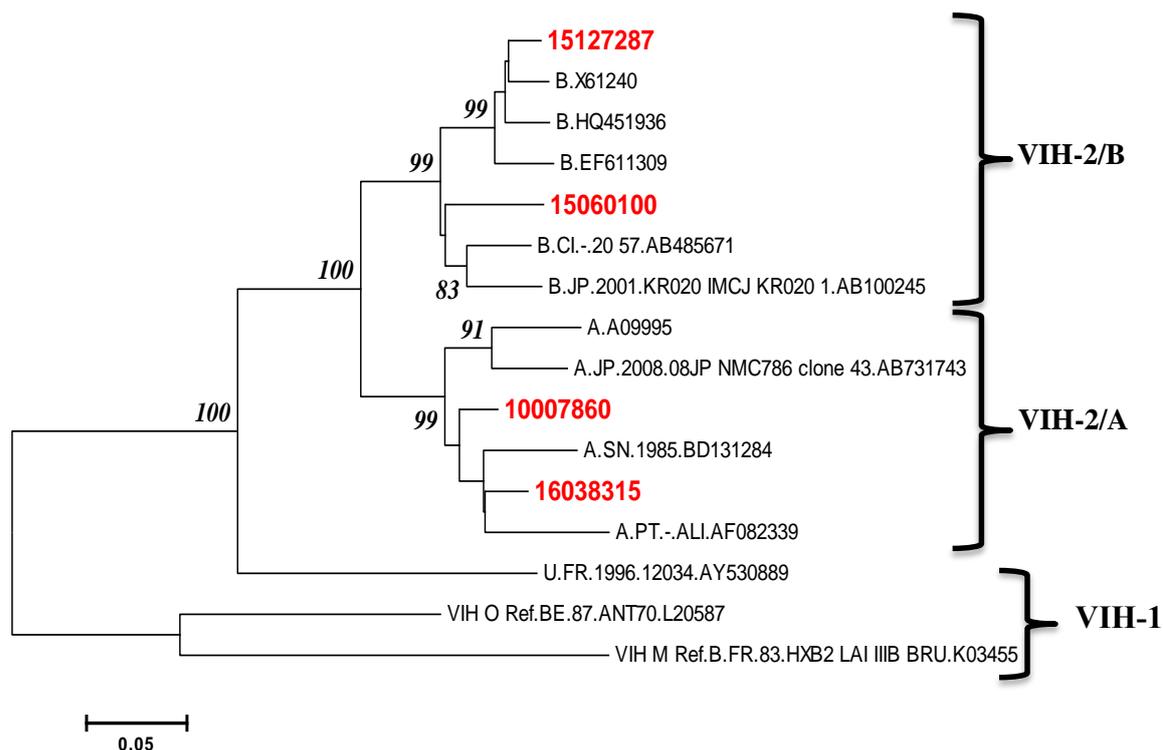


Figure 22 : Arbre phylogénétique construit à partir de la région protéase amplifiée et séquencée chez les VIH-2 positifs (100pb).

Les VIH-2 que nous décrivons sont représentés en rouge. L'évaluation de la robustesse des topologies des arbres a été faite par le test de « bootstrap » avec 1000 ré-échantillonnages « 1000 replicates ». Pour la clarté des arbres phylogénétique, le seuil de significativité considéré dans ce travail était de 70%.

III.2.2. Cas des échantillons collectés au cours de l'EDS 2011

Tous les échantillons VIH non M ont été caractérisés. Globalement, sur les 673 échantillons conclus VIH positifs au cours de l'EDS, quatre (0,6%) ont été mono-réactifs avec les peptides VIH-1/O ; ils ont été caractérisés dans 4 régions PR, TI, IN et Gp41 (tableau IX).

Tableau IX : Résultats des PCR M et O réalisées sur les VIH-1/O de l'EDS 2011

Code Patients	Résultats sérotypage	PCR M				PCR O				Profil moléculaire
		PR	TI	IN	Gp41	PR	TI	IN	Gp41	
526	VIH-1/O	-	-	-	-	+	+	+	+	VIH-1/O
4420	VIH-1/O	-	-	-	-	+	+	+	+	VIH-1/O
5246	VIH-1/O	-	-	-	-	+	+	+	+	VIH-1/O
14376	VIH-1/O	-	-	-	-	+	+	+	+	VIH-1/O

- : négatif ; + : positif ; PR : protéase ; TI : transcriptase inverse ; Gp41 : glycoprotéine 41 ; IN : Intégrase.

Pour tous les quatre échantillons réactifs VIH-1/O en sérotypie, les PCRs de confirmation spécifiques M et O effectuées ont montré une amplification positive uniquement pour le VIH-1/O dans les 4 régions ciblées analysées (tableau IX). Seuls les amplicons obtenus de la région intégrase ont été séquencés pour des analyses phylogénétiques. L'arbre phylogénétique construit montre que toutes les souches de O obtenues sont du sous-groupe H (figure 23).

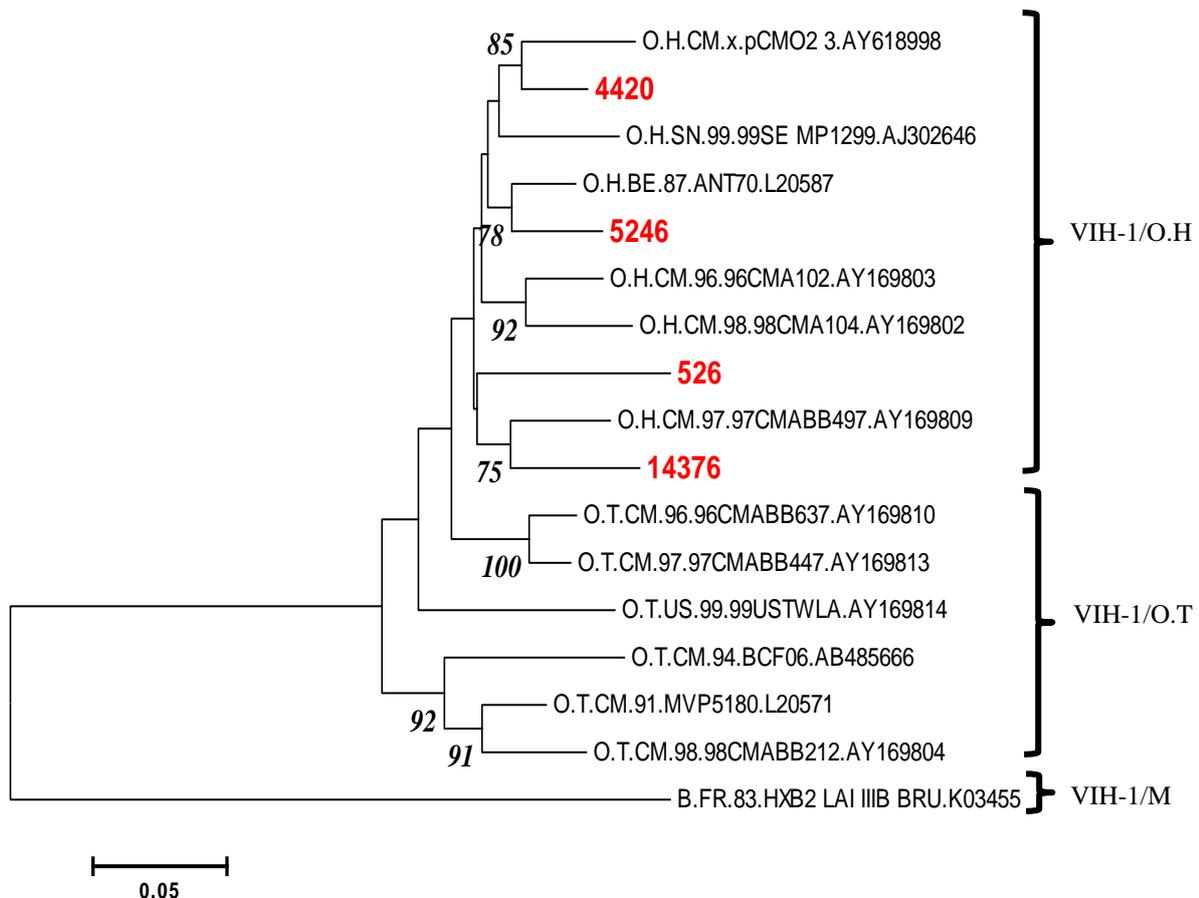


Figure 23 : Arbre phylogénétique représentant les différents groupes de VIH-1/O sur la gp41 de l'enveloppe (415pb).

Les échantillons O décrits sont représentés en rouge sur l'arbre. L'évaluation de la robustesse des topologies des arbres a été faite par le test de « bootstrap » avec 1000 ré-échantillonnages « 1000 replicates ». Pour la clarté des arbres phylogénétiques, le seuil de significativité considéré dans ce travail était de 70%.

III.3. Détermination du profil de résistance et fréquence de détection des différentes mutations de résistance du VIH circulant au Cameroun

La résistance du VIH aux molécules administrées aux patients camerounais a été identifiée à partir de nos deux sous-populations d'étude à savoir : les échantillons des plasmas des patients reçus en routine au CPC pour un test de résistance du VIH aux ARVs et les DBS conclus VIH positifs au cours de l'EDS de 2011.

III.3.1. Identification des résistances du VIH chez les patients reçus en routine au CPC

III.3.1.1. Caractéristiques de la population d'étude

D'août 2013 à décembre 2016, 295 patients infectés par le VIH ont été reçus au laboratoire de VIH du CPC pour un test de résistance aux ARVs (tableau X). L'âge médian de ces patients était de 44ans (IQR = 31 à 48 ans) ; parmi ces derniers, 50,7% (148) étaient des femmes, 38,3% (113) des hommes ; les données manquantes sur l'âge et le genre ont respectivement été observées pour 13,6% (40) et 10,8% (32) de patients. En effet, certains formulaires de renseignements utilisés en routine au CPC pour la réalisation de cette analyse n'étaient pas correctement remplis.

Du tableau X il ressort que 68,8% (203 sur 295) des patients avaient une charge virale plasmatique supérieure à 3log copies/mL, tandis que pour 7,5% (22 sur 295) cette CV était inférieure à 3log. Les fiches de certains patients 23,7% (70 sur 295) n'ont pas rendu de données sur la charge virale. La durée médiane du traitement aux ARVs est de 48 mois, soit quatre ans (IQR = 2-7 ans). Plus de la moitié des patients, soit 51,2% (151 sur 295), ont déclaré être en première ligne de traitement, 18,3 % (54 sur 295) en deuxième ligne ; près d'un tiers, soit 30,5% (90 sur 295), ignoraient leurs molécules de traitement. Les schémas thérapeutiques antirétroviraux utilisés pour les patients en première ligne de traitement ont été 3TC + TDF + EFV pour 106 patients sur 151 (70,2%), 3TC + AZT + NVP pour 42 patients sur 151 (27,8%) et 3TC + d4T + NVP pour 3 patients sur 151 (2%). Pour le traitement de deuxième ligne, le Lopinavir (LPV) est le seul inhibiteur de protéase retrouvé en combinaison avec 2INTIs : 3TC + TDF pour 31 patients sur 54 (57,4%), 3TC + AZT pour 17 patients sur 54 (31,5%) et ABC + ddI pour 6 patients sur 54 (11,1%).

Tableau X : Caractéristiques générales de la population considérée pour le test de résistance du VIH aux ARVs (N=295)

Patient	Médiane (IQR)	Nombre de patients (n)	Pourcentage (%)
Age (ans)	44(31-48)		
<15		33	11,2
15-50		171	58,0
>50		51	17,3
Pas d'information		40	13,6
<hr/>			
Genre			
Homme		113	38,3
Femme		150	50,5
Pas d'information		32	10,8
<hr/>			
CV (log)	4,9 (4,2-5,5)		
<3		22	7,5
3-5		95	32,2
>5		108	36,6
Pas d'information		70	23,7
<hr/>			
Durée du TARV (mois)	48 (24-84)		
<12		19	6,4
12-48		98	33,2
>48		86	29,2
Pas d'information		92	31,2
<hr/>			
TARV			
Première ligne		151	51,2
3TC+TDF+EFV		106	70,2*
3TC+AZT+NVP		42	27,8*
3TC+d4T+NVP		3	2*
Deuxième ligne		54	18,3
3TC+TDF+LPV/r		31	57,4*
3TC+AZT+LPV/r		17	31,5*
ABC+ddI+LPV/r		6	11,1*
Pas d'information		90	30,5

Le pourcentage des différents groupes est le rapport entre le nombre de patients dans chaque groupe (n) X100 et le nombre total de patients (N) ; à l'exception des groupes des patients sur première et deuxième lignes où le pourcentage (*) a été déterminé en utilisant le rapport du nombre de patients de chaque combinaison d'ARVs X100 sur le nombre total de personnes sur cette ligne de traitement (en gras).

ABC, abacavir ; AZT, zidovudine ; CV, charge virale ; d4T, stavudine ; EFV, efavirenz ; IIQ, intervalle interquartile ; LPV/r, lopinavir/ritonavir ; N, nombre de patients reçu dans l'étude ; n, le nombre de patients dans chaque groupe ; NVP, névirapine ; TDF, ténofovir ; TARV, traitement antirétroviral ; 3TC, lamivudine.

III.3.1.2. Analyse phylogénétique des séquences obtenues

Après séquençage des régions protéase et transcriptase inverse du gène de la polymérase, des 295 échantillons de plasmas des patients reçus, la répartition des sous-types du VIH a montré que la plupart de ces sujets étaient infectés par des VIH-1/M du sous-groupe non-B qui comprennent six sous-groupes et trois formes recombinantes circulantes notamment: A pour 17 patients (5,8%), C pour 1 patient (0,3%), D pour 11 patients (3,7%), F pour 13 patients (4,4%), G pour 14 patients (4,7%), H pour 2 patients (0,7%), CRF02_AG pour 220 patients

(74,6%), CRF01_AE pour 3 patients (0,3%) et CRF_11-cpx pour 12 patients (4,1%). Une infime proportion de ces patients 0,7% (2 sur 295) s'est trouvée infectée par le VIH-1/O du sous-groupe H. Ces résultats sont illustrés dans le camembert de la figure 24.

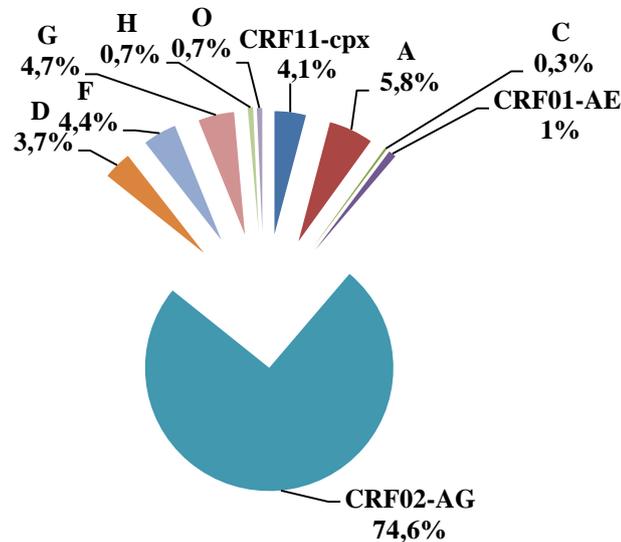


Figure 24 : Taux de répartition des différents sous-types du VIH circulant dans la population étudiée.

Ainsi, le sous-groupe CRF02_AG a prédominé chez les patients reçus, suivi par le sous-type A et G.

III.3.1.3. Mutations de résistance

Les différentes mutations de résistance circulant au sein de la sous-population d'étude ont été identifiées sur le génome viral (figure 25). Chez les INTI, la mutation prédominante est la M184V/I avec un taux de 75,3% (222 individus sur 295) ; elle est suivie de la T215Y/F/C (29,8% ; 88 individus). Il a également été noté une faible expression de la mutation A62R (1,4% ; 4 individus) dans ce groupe. Concernant les INNTI, les mutations prédominantes ont, par ordre de grandeur décroissante, été la K103S/N/R (47,8% ; 141 individus), la Y181C (26,1% ; 77 individus) et la G190 A/S (22,4% ; 66 individus). Aucune insertion au codon 69 n'a été identifiée. Par ailleurs, chez les inhibiteurs de protéase (IP), une forte expression des mutations de polymorphisme a été observée avec une prédominance de celle de la M36I/L (96,6% ; 285 individus) suivie par ordre décroissant de la H69K/N/R/Q (94,6% ; 279 individus), la L89M/I/V (92,9%, 274 individus) et de la K20R/I (82% ; 242 individus).

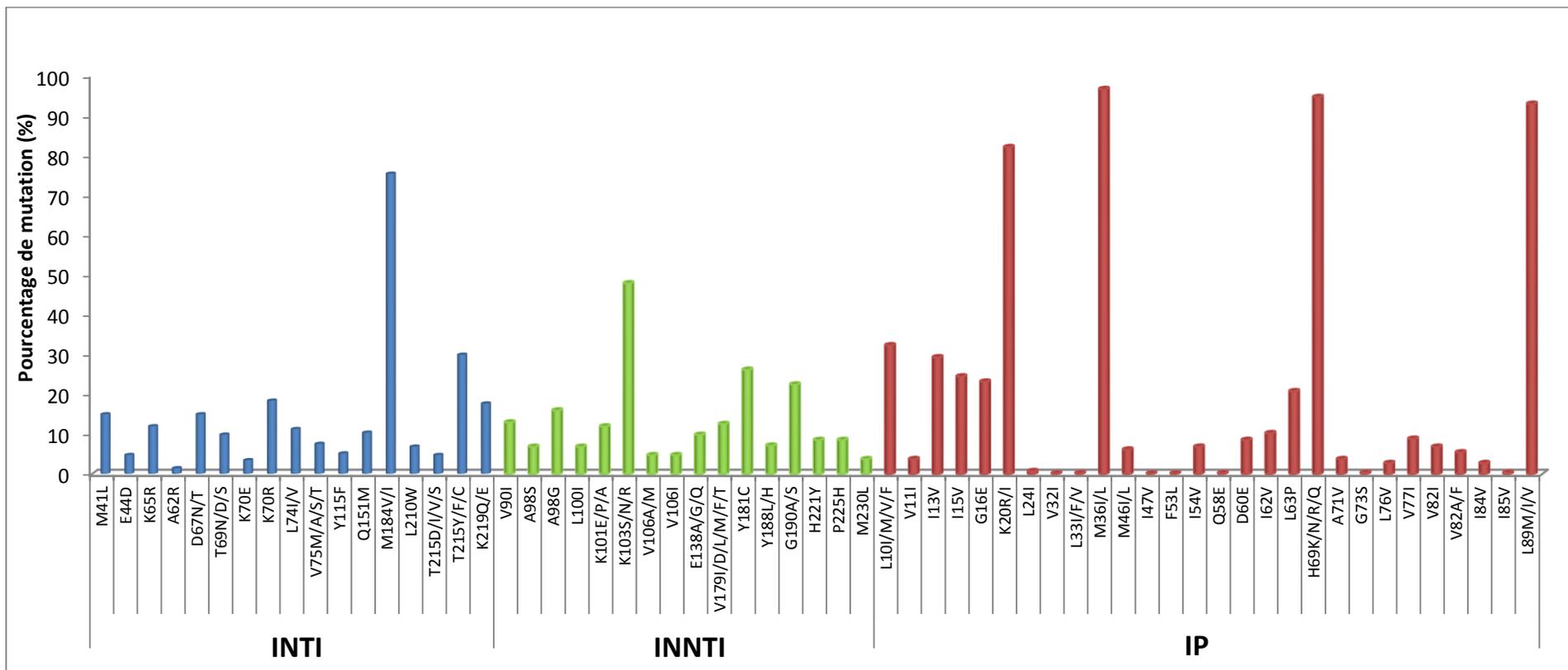


Figure 25 : Différentes mutations observées chez les VIH circulant au sein des 295 patients reçus en routine au CPC

A : Alanine ; C : Cystéine ; D : Aspartic ; E : Glutamic ; F : Phénylalanine ; G : Glycine ; H : Histidine ; I : Isoleucine ; IP : Inhibiteur de protéase ; INTI : Inhibiteur nucléotidique de transcriptase inverse ; INNTI : Inhibiteur non nucléotidiques de transcriptase inverse ; K : Lysine ; L : Leucine ; N : Asparagine ; M : Méthionine ; P, Proline ; Q : Glutamine ; R, Arginine ; S : Serine ; T : Thréonine ; V : Valine ; W : Tryptophane ; Y : Tyrosine.

Ces mutations des virus portés par les patients ont permis de statuer sur le caractère sensible, résistant et résistance possible du virus aux ARVs.

III.3.1.4. Résistance du VIH aux ARVs

➤ Description de la résistance en fonction des classes d'ARVs utilisées

Les différentes résistances aux ARVs observées pour les deux régions analysées (PR et TI) ont rendu les résultats du tableau XI.

Tableau XI: Résistance du VIH aux différents ARVs

ARVs		Résultat du test		
Classes	Noms	Sensible	Résistant possible	Résistant (%)
IP	IDV	266	1	28 (9,5)
	SQV/r	227	37	31(10,5)
	NFV	274	9	12 (4,1)
	FPV/r	273	0	22 (7,5)
	LPV/r	271	5	19 (6,4)
	ATV/r	267	12	16 (5,4)
	TPV/r	16	17	262 (88,8)
	DRV/r	289	2	4 (1,4)
INTI	ZDV/AZT	186	2	107 (36,3)
	3TC/FTC	72	1	222 (75,3)
	ddI	229	10	56 (19,0)
	d4T	154	3	138 (46,8)
	ABC	152	45	98 (33,2)
	TDF	207	13	75 (25,4)
INNTI	EFV	71	0	224 (75,9)
	NVP	69	0	226 (76,6)
	ETV	199	35	61 (20,7)
	RPV	136	0	159 (53,9)

Le pourcentage de résistance représente le rapport entre le nombre de patients présentant une résistance à une molécule et le nombre total de patients reçus. N=295

ABC, abacavir ; ARVs, antirétroviraux ; ATV/r, atazanavir ; ddI, didanosine ; DRV/r, darunavir ; d4T, stavudine ; EFV, éfavirenz ; ETV, étravirine ; FPV/r, fosamprénavir ; IDV, indinavir ; INTI, Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse ; INNTI, inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse ; IP, inhibiteurs de la protéase ; LPV/r, lopinavir ; NFV, nelfinavir ; NVP, névirapine ; r, ritonavir ; RPV, rilpivine ; SQV/r, saquinavir ; TDF, ténofovir ; TPV/r, tipranavir ; ZDV/AZT, zidovudine ; 3TC/FTC, lamivudine/Emtricitadine.

De façon globale, et pour les INTI, la résistance à la Lamivudine est prépondérante (75,3% ; 222 patients) ; elle est suivie par la Stavudine (46,8% ; 138 patients) et la Zidovudine (36,3% ; 107 patients). Dans cette classe d'ARVs, la résistance à la Didanosine (19% ; 56 individus) a été la moins observée. Concernant les INNTI, 226 patients (76,6%) ont été

résistants à la Névirapine ; 224 autres (75,9%) l'ont été à l'Efavirenz, alors qu'une résistance relativement faible à l'Etravirine (20,7 %) a été observée chez 61 individus. Pour les IP, une faible résistance a été remarquée pour l'ensemble des molécules, soit moins de 10% dans la plupart des cas), exception faite de la Tipranavir pour laquelle un taux de résistance de 88,8% (262 individus) a été trouvée. La molécule la plus efficace dans ce groupe est le Darunavir avec 1,4% de résistance chez 4 patients seulement.

➤ Résistance en fonction des combinaisons de TARV utilisées

De façon générale, 69,5% (205 individus sur 295) des patients enregistrés maîtrisaient les informations sur leur protocole de traitement antirétroviral. L'analyse des différents schémas thérapeutiques a montré que pour les INTI, la molécule la plus prescrite aux patients est la Lamivudine (97,1% ; (199 individus) ; elle est suivie du Tenofovir (66,8% ; 137 individus). Parmi les IP, seule le Lopinavir été administré. Parmi les patients traités avec la 3TC en première et deuxième lignes, 76,4% (152 patients sur 199) ont été porteurs d'un virus résistant à cette molécule, alors que 36,5% (50 patients sur 137) des patients ont hébergé un virus résistant au Tenofovir sur les deux lignes. En plus, sur les 151 sujets sous traitement en première ligne, 121 (80,1%) se sont révélés infectés par un virus résistant à la Lamivudine alors que 57 (41,6%) ont montré une résistance au Tenofovir. En deuxième ligne, sur les 54 patients ayant des informations sur leur traitement ARV, 68,5% (37 individus sur 54) ont résisté à la Lamivudine et 16,7% (9 individus sur 54) au Tenofovir (tableau XII).

Tableau XII : Résistance aux différents traitements et aux molécules utilisées

TARV	Nombre de patients sous TARV (%)	TDF	EFV	AZT	NVP	d4T	ABC	ddI	LPV	
		Nombre de patients avec un virus résistant à la molécule correspondante par rapport à la ligne de TARV (% de résistance en fonction des molécules administrées)								
Première ligne	151 (73,7)	121 (80,1)	57 (41,6)	124 (82,1)	47 (31,1)	125 (82,8)	71 (47,1)	-	-	-
3TC+TDF+EFV	106 (70,2)	84 (79,2)	46 (43,4)	89 (84)	26	89	50	-	-	-
3TC+AZT+NVP	42 (27,8)	35 (83,3)	9	33	20 (47,6)	34 (81)	20	-	-	-
3TC+d4T+NVP	3 (2)	2 (66,7)	2	2	1	2 (66,7)	1 (33,3)	-	-	-
Deuxième ligne	54 (26,3)	37 (68,5)	9 (16,5)	-	22 (40,7)	-	-	12 (22,2)	4 (7,4)	10 (18,5)
3TC+TDF+LPV/r	31 (57,4)	19 (61,3)	4(12,9)	-	12	-	-	6	0	6 (19,4)
3TC+AZT+LPV/r	17 (31,5)	12 (70,6)	3	-	5 (29,4)	-	-	4	2	3 (17,6)
ABC+ddI+LPV/r	6 (11,1)	6	2	-	5	-	-	2 (33,3)	2 (33,3)	1 (16,7)

Le tableau montre (en gras) le nombre de patients admis sur les différentes lignes de traitements et résistants aux molécules utilisées.

ABC, Abacavir ; AZT, Zidovudine ; ddI, Didanosine ; d4T, Stavudine ; EFV, Efavirenz ; LPV/r, Lopinavir ; NVP, Névirapine ; TARV, Traitement antirétroviraux ; TDF, Ténofovir ; 3TC, Lamivudine. N=205

En première ligne, parmi les 106 patients traités avec le 3TC + TDF + EFV, 84 (79,2%) ont résisté à la 3TC, 46 (43,4%) au TDF et 89 (84%) à EFV. Des 42 patients mis sous 3TC + AZT + NVP, 35 (83,3%) ont été résistants à la 3TC, 20 (47,6%) à l’AZT et 34 (81%) à la NVP. Enfin des 3 malades traités avec le 3TC + d4T + NVP, 2 (66,7%) ont résisté à la 3TC et à la NVP et un seul à la d4T (tableau XII).

Sur les 54 patients mis sur traitement de deuxième ligne, 31 (57,4%) ont reçu la combinaison de 3TC + TDF + LPV ; parmi eux 19 (61,3 %), 4 (12,9%) et 6 (19,4%) ont été déclarés résistants respectivement à la 3TC, au TDF et à la LPV. Dix-sept autres patients ont été soumis à la combinaison 3TC + AZT + LPV ; parmi eux 12 (70,6%) ont résisté au 3TC, 5 (29,4%) à l’AZT et 3 (17,6%) à la LPV. Quant aux 6 patients traités avec la combinaison ABC + ddI + LPV, 2 (33,3%) ont été déclarés résistants à l’ABC et à la ddI ; enfin un seul (16,7%) a été résistant à la Lopinavir.

Chez certains malades, la résistance a été observée à plus d’une des molécules de leur combinaison de TARV. Cette multi-résistance a été surtout notée chez les personnes sous traitement en première ligne comparées à celle traitées en deuxième ligne (tableau XIII).

Tableau XIII : Résistance des patients aux molécules administrées

TARV	Nombre de patients résistants (%)				Total patients
	Aucune	1	2	3	
1 ^{ère} ligne	23 (15,2)	8 (5,3)	60 (39,7)	60 (39,7)	151
2 nd ligne	17 (31,5)	20 (37)	11 (20,4)	6 (11,1)	54
Total	40	28	71	66	205

Sur ce tableau, les pourcentages ont été calculés par ligne de traitement.

Ainsi, sur les 151 sujets traités en première ligne, 60 (39,7%) ont résisté à deux des trois médicaments qui leur ont été administrés. Ce résultat indique que ces personnes étaient de bons répondeurs à une seule de ces trois molécules donc en monothérapie fonctionnelle. Soixante autres malades (39,7%) ont été résistants aux trois molécules utilisées pour leur traitement. Concernant la deuxième ligne de traitement, 20,4% des induits sur 54 ont été résistants à deux des trois molécules présentes dans leur trithérapie et 11,4% soit 6 personnes sur 54 ont résisté à toutes les molécules utilisées pour leur traitement.

Concernant les personnes infectées par le VIH-1/O, deux ont été reçues au cours de cette étude ; parmi ces dernières, seule une a résisté à tous les ARVs ciblant les deux régions d’intérêt, à l’exception du Nelfinavir, Tipranavir et Didanosine. Le deuxième échantillon quant à lui a

résisté à tous les INNTI et à la Zidovudine, la Lamivudine et la Stavudine concernant les INTI ; mais sensible à tous les IP. Néanmoins, concernant les molécules administrées, ces deux patients ont hébergé des virus résistants à une et deux molécules de leur trithérapie respectivement.

➤ Evolution de la résistance du VIH aux ARVs au fil des années

Sur les quatre années de cette étude, parmi les 205 personnes pour lesquelles on a disposé des informations sur le protocole de traitement, 9 (4,4%) ont été reçues en 2013, 44 (21,5%) en 2014, 65 (31,7%) en 2015 et 87 (42,4%) en 2016. L'observation faite sur les neuf molécules identifiées dans les protocoles de traitement a montré une évolution constante, année après année, du nombre de patients traités avec les molécules identifiées et dans le même ordre, de la résistance à ces molécules à l'exception du TDF. Au total, 137 (66,8 %) patients sur les 205 observés avaient le TDF dans leur combinaison de traitement. Parmi ces malades, 50 (36,5%) ont hébergé un virus résistant au TDF. Il est noté année après année, une augmentation statistiquement significative ($P = 0,02$) du nombre de patients traités avec le Ténofovir ; partant de 33,3% (3/9) en 2013, 52,3 % (23/44) en 2014, 70,8 % (46/65) en 2015 et 74,7 % (65/87) en 2016 (figure 26). Dans le même sens, une augmentation statistiquement significative ($P = 0,01$) de la résistance du VIH au Ténofovir chez les patients traités avec cette molécule a également été observée à partir de 2014 avec des taux allant de 21,7% (5/23), 26,1% (12/46) à 47,7% (31/65) en 2014, 2015 et 2016 respectivement (figure 26).

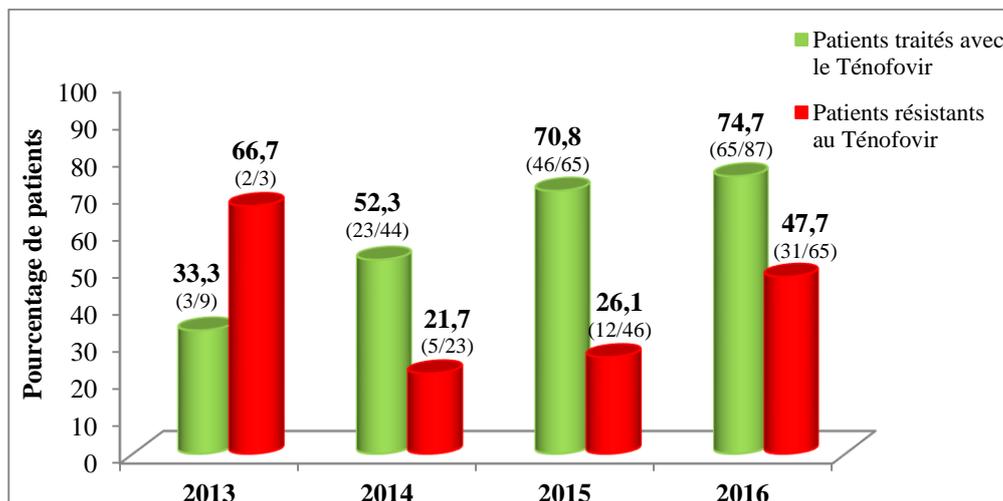


Figure 26 : Evolution du nombre de patients traités au Ténofovir, et de la résistance du VIH à cette molécule chez ces patients de 2013 à 2016

En vert, le pourcentage des patients sous Ténofovir par année ; soit le nombre de patients traités avec le Ténofovir dans l'année X100, sur le nombre de patients de la même année pour lesquels on dispose des informations sur le protocole de traitement. En rouge, le pourcentage des patients résistants au Ténofovir par année ; soit le nombre de malade résistants au Ténofovir dans l'année X100, sur le nombre de patients de la même année traités avec le Ténofovir.

La résistance du VIH au Ténofovir a été détectée exclusivement chez les patients en première ligne de traitement. Les mutations observées chez les patients possédant un virus résistants au Ténofovir dans cette étude ont été : la K65R/E à 51 %, suivie dans l'ordre décroissant de la M41L (32%), T215Y (26%), K70E (23%), L210W (19%), E44D (17%), D67N (17%), L74V/I (17%) et enfin T69D/N (11%). Nos analyses ont également montré une association positive entre la résistance au TDF et la durée de traitement chez les personnes traitées avec cette molécule. Cette corrélation a été observée en particulier chez les patients ayant le Ténofovir dans leur protocole de traitement depuis un an ($p = 0,03$) et 2 ans ($p = 0,01$). En outre, il a été constaté que l'utilisation de la combinaison Ténofovir associée à la Lamivudine et l'Efavirenz en première ligne de traitement chez un patient augmente le risque d'apparition de résistances au TDF ($p = 0,004$).

En ce qui concerne les personnes non traités avec le Ténofovir, une augmentation pas statistiquement significative de la résistance au TDF a été observée partant de 14,3% (3/21) en 2014, à 21,1% (4/19) et 27,3% (6/22) en 2015 à 2016 respectivement. Dans ce groupe de patients, toutes les résistances étaient pour la plupart observées chez les patients sous traitement de première ligne.

III.3.2. Identification des résistances du VIH dans la population de l'EDS

III.3.2.1. Caractérisation de la population d'étude

La résistance au sein de la population de l'EDS a été recherchée sur les 673 échantillons de sang séchés sur papier buvard collectés au cours de l'EDS 2011. Les régions protéase et transcriptase-inverse du gène de la polymérase analysées par PCRs ont permis d'obtenir sur ces 673 échantillons de DBS, une amplification positive consécutivement sur les deux régions chez 294 (43,7%) DBS, une amplification positive uniquement dans la région PR ou TI chez 67 (10%) et 59 (8,8%) DBS respectivement, et les échecs d'amplifications dans les deux régions ont été identifiés chez 253 (37,5%) DBS dans toutes des PCRs réalisées.

Seuls les échantillons de DBS avec des amplifications positives à la fois en PR et TI ont été séquencés, soit 294 amplicons. Parmi ces échantillons, 160 (54,4%) ont eu un séquençage positif sur les deux régions, 25 (8,5%) et 18 (6,1%) amplicons ont obtenus une amplification positive uniquement en protéase ou en transcriptase-inverse respectivement, et 91 (31%) amplicons ont eu des échecs de séquençage dans les deux régions (tableau XIV).

Tableau XIV : Bilan des résultats du séquençage obtenus dans les deux régions

Transcriptase-inverse (TI)	Protéase (PR)		Total
	PR+	PR-	
TI+	160	18	178
TI-	25	91	116
Total	185	109	294

PR+, séquençage positif en protéase ; PR-, échec de séquençage de la protéase ; TI+ séquençage positif en transcriptase inverse ; TI- échec de séquençage de la transcriptase inverse.

III.3.2.2. Identification des génotypes du VIH observés

Les séquences obtenues des 160 DBS séquencés sur les deux régions ont été utilisées pour les analyses phylogénétiques afin d'identifier les différents génotypes. L'arbre phylogénétique construit avec certaines séquences de référence du VIH a montré que ces échantillons étaient infectés par des VIH-1/M de sous-types non-B pour la plupart, soit dans l'ordre décroissant les sous-types CRF02_AG pour 100 échantillons (62,5%), A pour 17 échantillons (10,6%), F et G pour 10 échantillons (6,3%) chacun, CRF01_AE et CRF11-cpx pour 5 échantillons (3,1%) chacun, J pour 4 échantillons (2,5), CRF13_cpx pour 2 échantillon (1,3%), CRF06_cpx, CRF18_cpx et CRF09_cpx pour 1 échantillon (0,6%) chacun; une infime proportion de ces échantillons 2,5% (4 sur 160) était infectée par le VIH-1/O du sous-groupe H. Ces résultats sont illustrés dans le camembert de la figure 27.

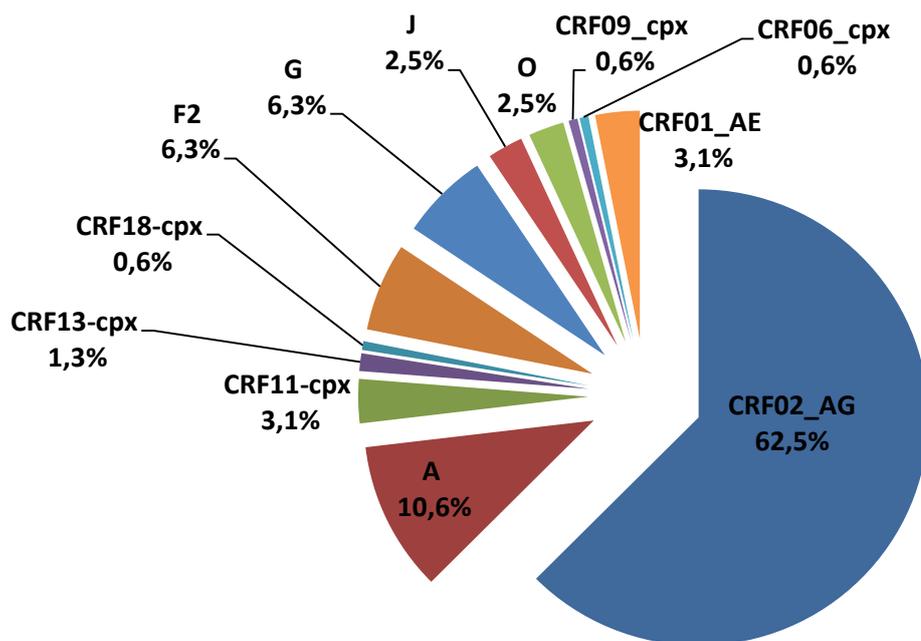


Figure 27 : Génotypes de VIH circulant dans la population de l'EDS

Ainsi, le sous-groupe CRF02_AG prédomine à 62,5% (100/160) chez les patients reçus ; il est suivi par le sous type A. Une faible proportion de VIH-1/O (2,5%) a également été observée.

III.3.2.3. Mutations de résistance observées dans la population de l'EDS

Les différentes mutations de résistance observées au sein de cette population d'étude ont été identifiées sur le génome viral (figure 28). De façon générale, sur des trois classes d'ARVs étudiés, une très faible expression des mutations qui confèrent les résistances a été observée (moins de 10%) et une forte représentation des mutations de polymorphismes (plus de 80%) a également été obtenue.

Chez les INTI, parmi les quelques mutations observées, la mutation prédominante est la M184V/I 5,6% (9 individus sur 160). Elle est suivie de la T215Y/F/C (5% ; 8 individus sur 160). Concernant les INNTI, Les mutations les plus exprimées sont la V90I et V179I/D (3,1% ; 5 individus sur 160) respectivement. Aucune insertion n'a été remarquée au codon 69. Par ailleurs, chez les IP, une forte expression de la mutation M36I/L 97,5% (156 DBS sur 160) a été observée, suivie des mutations H69K/N/R/Q et L89M/I/V à 96,3% (154 DBS sur 160) et 95% (152 DBD sur 160) respectivement. Tous ces résultats sont résumés dans la figure 28 présentée Ci-dessous.

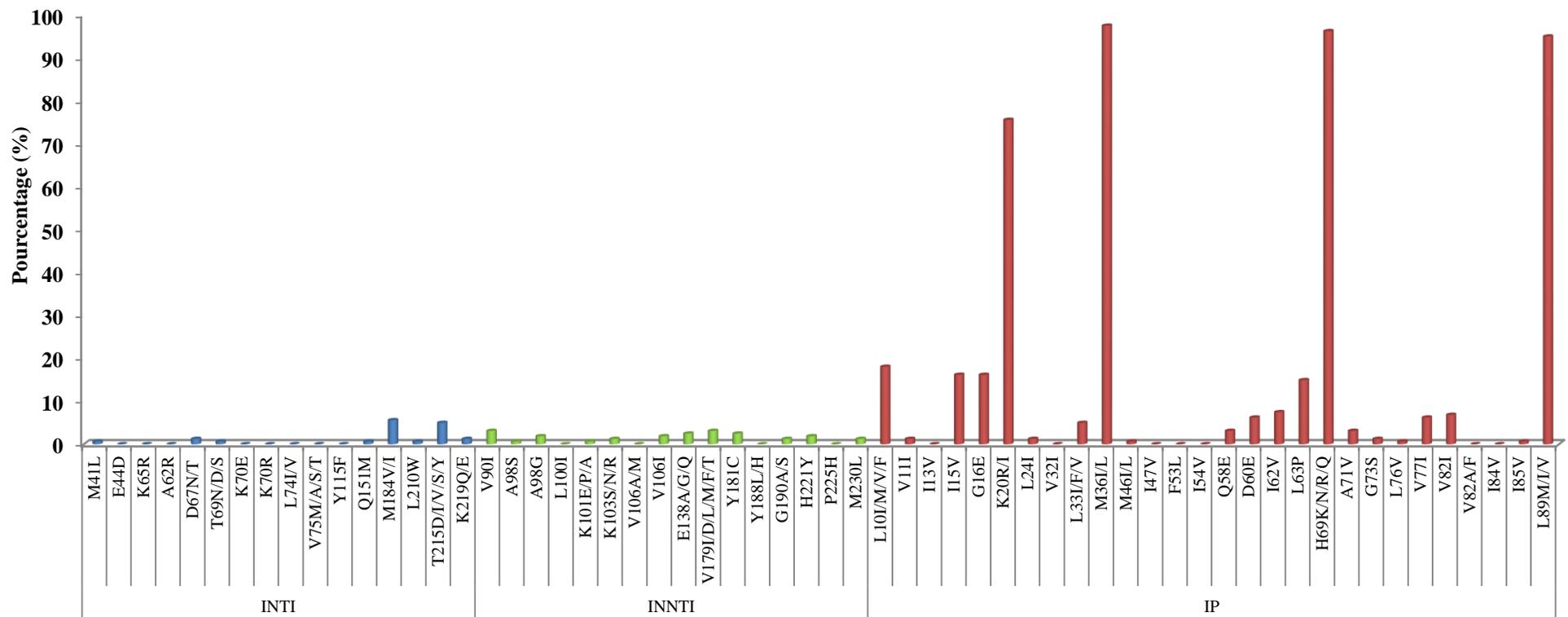


Figure 28 : Différentes mutations de résistances observées chez les VIH circulants au sein des 160 DBS analysés.

A : Alanine ; C : Cystéine ; D : Aspartic ; E : Glutamic ; F : Phénylalanine ; G : Glycine ; H : Histidine ; I : Isoleucine ; IP : Inhibiteur de protéase ; INTI : Inhibiteur nucléotidique de transcriptase inverse ; INNTI : Inhibiteur non nucléotidiques de transcriptase inverse ; K : Lysine ; L : Leucine ; N : Asparagine ; M : Méthionine ; P, Proline ; Q : Glutamine ; R, Arginine ; S : Serine ; T : Thréonine ; V : Valine ; W : Tryptophane ; Y : Tyrosine.

III.3.2.4. Résistance aux ARVs

Globalement, une faible résistance a été observée au sein de cette population. Le tableau XV résume les résultats obtenus.

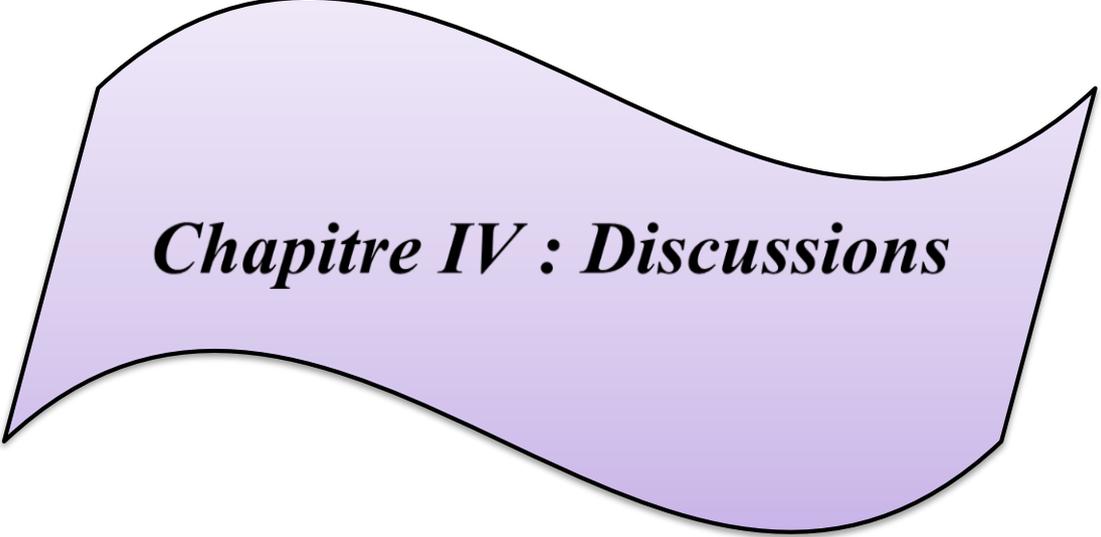
Tableau XV : Interprétation de la résistance observée au sein de la population de l'EDS

ARVs		Résultat du test		
Classes	Noms	Sensible	Résistant possible	Résistant (%)
IP	IDV	159	0	1(0,6)
	SQV/r	124	23	13(8,1)
	NFV	155	5	5(3,1)
	FPV/r	160	0	0 (0,0)
	LPV/r	157	1	2 (1,3)
	ATV/r	145	11	4 (2,5)
	TPV/r	2	10	148 (92,5)
	DRV/r	159	0	1 (0,6)
INTI	ZDV/AZT	120	0	10 (6,3)
	3TC/FTC	152	0	8 (5,0)
	ddI	159	0	1 (0,6)
	d4T	151	0	9 (5,6)
	ABC	150	9	1 (0,6)
	TDF	160	0	0 (0,0)
INNTI	EFV	150	0	10 (6,3)
	NVP	150	3	7 (4,4)
	ETV	148	2	10 (6,3)
	RPV	147	0	13 (8,1)

Le pourcentage de résistance représente le rapport entre le nombre de patients présentant une résistance à une molécule et le nombre total de patients analysés. N=160

ABC, abacavir ; ARVs, antirétroviraux ; ATV/r, atazanavir ; ddI, didanosine ; DRV/r, darunavir ; d4T, stavudine ; EFV, éfavirenz ; ETV, étravirine ; FPV/r, fosamprénavir ; IDV, indinavir ; INTI, Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse ; INNTI, inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse ; IP, inhibiteurs de la protéase ; LPV/r, lopinavir ; NFV, nelfinavir ; NVP, névirapine ; r, ritonavir ; RPV, rilpivine ; SQV/r, saquinavir ; TDF, ténofovir ; TPV/r, tipranavir ; ZDV/AZT, zidovudine ; 3TC/FTC, lamivudine/Emtricitadine.

De façon globale, concernant les INTI, la résistance la plus récurrente est celle à la Zidovudine (6,3% ; 10 patients), suivie par la Stavudine (5,6% ; 9 DBS) et la Lamivudine (5% ; 8 patients). Tandis que, concernant les INNTI, la résistance à la Rilpivirine était prédominante à 8,1% (13 DBS sur 160). Par contre, chez les IP, la résistance la plus exprimée était celle à la Saquinavir à 8,1% (13 DBS sur 160). Une résistance naturelle au Tipranavir à 92,5% (148 sur 160 DBS) a été également obtenue.



Chapitre IV : Discussions

IV.1. Détermination de la fréquence de détection des différents variants du VIH circulant au Cameroun

Le premier objectif de ce travail était de déterminer la proportion des différents variants du VIH circulant au Cameroun. Cette étude a été précédée par plusieurs autres réalisées sur la diversité génétique du VIH au Cameroun ; celles-ci ont établi que tous les types de VIH (1 et 2) et tous les groupes de VIH-1 (M, N, O et P) circulent dans notre pays (Mourez *et al.*, 2013). Ayouba *et al.* (2001) ont aussi évalué l'évolution des différents variants du VIH au Cameroun de 1986 à 1998. Leur analyse a chevauché celle de Vergne *et al.* (2003) menée sur six ans (de 1996 à 2001) avec 1469 échantillons VIH positifs collectés dans la ville de Yaoundé. A partir d'une étude menée de 2006 à 2007, Verssiere *et al.* (2010b) ont mis à jour les données de Ayouba *et al.* (2001) et de Vergne *et al.* (2003) qui ont, par la suite, été bien documentées par Villabona *et al.* (2015) pour la période de 2006 à 2013. Ces quatre études ont bien montré la présence du variant VIH-1/O au Cameroun et que celui-ci a tendance à avoir une évolution constante avec le temps. Cependant, bien que ces études montrent la circulation de certains variants au Cameroun, leur échantillonnage est resté parcellaire puisque essentiellement réalisé dans les régions du Centre et du Nord. De plus, les fréquences de ces variants étant obtenues des échantillons de convenance des patients majoritairement reçus dans des centres hospitaliers, ceci constitue un biais dans l'estimation des prévalences. Pour corriger cette limite, le présent travail a utilisé deux sous-populations d'étude. La première sous-population est constituée des échantillons de plasmas de patients reçus au CPC de 2010 à 2016 pour une sérologie VIH ; elle a permis (1) une nouvelle détermination des proportions des différents variants de VIH circulant au Cameroun pendant cette période et (2) une mise à jour des données sur ce sujet. La deuxième sous-population d'étude est celle des échantillons de DBS collectés au Cameroun au cours de l'enquête démographique de santé réalisée en 2011. Ces échantillons ont permis d'avoir des estimations nationale et régionales.

Parmi les 83254 échantillons testés au CPC, de 2010 à 2016, 57552 (69,1%) ont eu une sérologie VIH négative, 24449 (29,4%) une sérologie VIH positive, et 1253 (1,5%) une sérologie VIH indéterminée. Cette proportion des cas positifs de 29,4% est proche de 26,7% obtenue par Ayouba *et al.* (2001) chez des patients reçus au CPC entre 1986 et 1998; elle est toutefois très élevée comparée à la prévalence nationale de 4,3 % obtenue des échantillons de l'EDS 2011 (ORC-Macro, 2011). Cet écart de proportions peut être expliqué par le fait que le CPC, laboratoire national de référence pour le diagnostic et le suivi des personnes vivant avec le VIH (PVVIH), reçoit beaucoup d'échantillons de patients provenant de nombreux centres de santé des dix régions de notre pays, pour confirmation du diagnostic VIH. Cette situation crée

un énorme biais au niveau de la sélection des échantillons analysés en routine au CPC par rapport à l'EDS.

Cependant, le taux des personnes déclarées VIH positifs au CPC a diminué avec le temps, passant de 53,2% en 2010 à 15,5% en 2016 (OR=0,16 ; CI =0,15-0,17 ; P=0,001). Ce résultat va dans le même sens que celui observé à l'échelle nationale. Une diminution de la prévalence du VIH au Cameroun a d'ailleurs déjà été observée lors des deux précédents EDS, partant de 6,7% en 1998 à 5,5% en 2004 ; la prévalence de 4,3% obtenue au cours de l'EDS-2011 a aussi confirmé cette baisse de l'infection à VIH dans notre pays. Une récente étude, nommée CAMPHIA « *Cameroon population-based HIV impact assessment* », a confirmé la diminution de la prévalence du VIH, qui est passée de 4,3% avec l'EDS-2011 à 3,2% en 2018 (Phia-projet, 2018). Le renforcement de la politique de lutte contre le VIH au Cameroun, l'amélioration de la prise en charge avec la gratuité des ARVs qui a élevé le nombre de patients mis sous TARV, le renforcement de la prévention de la transmission du VIH de la mère à l'enfant (PTME) avec adoption de l'option B+ en 2013 et l'adoption de la stratégie de « Test and Start » de l'OMS en 2015, sont quelques facteurs qui contribuent positivement à la diminution de la prévalence du VIH dans notre pays.

Parmi les 24449 échantillons positifs analysés au CPC de 2010 à 2016, le sérotypage a rapidement discriminé les mono-réactivités sérologiques VIH-1/M, O, N ou VIH-2 et les doubles réactivités VIH-1/M+O. Concernant les cas de mono-réactivités, les résultats ont montré une prédominance de celles dirigées contre les VIH-1/M à 98,5%, suivies de celles contre, des VIH-1/O à 0,5%, enfin une faible circulation des VIH-1/N et VIH-2 à 0,04% et 0,08% respectivement. Les doubles réactivités VIH-1/M+O quant à elles ont été retrouvées à 0,3%. Chez les échantillons collectés pendant l'EDS-2011, les variants M ont été observés à 95%, les variants O à 0,6%. Ni les variants VIH-1/N ou VIH-2, ni des doubles réactivités VIH-1/M+O n'ont pas été obtenus. Le variant VIH-1/P n'a été observé dans aucune des deux sous-populations d'étude ce qui démontré la rareté de ce variant. La forte prédominance du variant M (à plus de 90%) dans ces deux sous-populations d'étude est en accord avec les données de Villabona *et al.* (2015) et reflète la réalité épidémiologique du VIH au Cameroun.

Le taux de positivité du VIH-1/O a été de 0,5% avec des échantillons analysés dans le cadre du dépistage au CPC ; il est différent de 1,7% rendu par Vergne *et al.* (2003) après dépistage de 1469 patients dans une structure hospitalière de la ville de Yaoundé, entre 1996 et 2001. Il s'écarte aussi de 1% calculé par Vessière *et al.* (2010b) avec des échantillons analysés au CPC entre 2006 et 2007. Toutefois, il est proche de la valeur 0,4% obtenue sur la période 2006-2009 (De Oliveira *et al.*, 2017) et de (0,6%) qu'indiquent Villabona-Arenas *et al.* (2015)

pour les échantillons reçus au CREMER de 2006 à 2013. Le rapprochement de la proportion des VIH-1/O positifs obtenue en routine au CPC de 0,6% déterminée avec les échantillons collectés au cours de l'EDS-2011 reflèterait la situation actuelle dans la population générale camerounaise. Ayant utilisé la même méthodologie que Vessière *et al.* (2010b), les premiers résultats montrent une diminution de la proportion de cas VIH-1/O au fil du temps jusqu'en 2009. Cette proportion est passée de 1% entre 2006 et 2007 à 0,4% entre 2006-2009 ; ensuite elle s'est stabilisée à 0,5% entre 2010 et 2016. Ce résultat est le même que celui d'Ayouba *et al.* (2001) qui ont observé une baisse de la prévalence du VIH-1/O de 0,8%, entre 1994 et 1995, à 0,4% entre 1997 et 1998 dans la région du Centre.

Les doubles réactivités sérologiques VIH-1/M+O évaluées à 0,3% sur 7ans, chez les patients reçus en routine au CPC, n'ont pas été détectées sur les échantillons de l'EDS-2011. Cette conclusion se rapproche de celle de Vessière *et al.* (2010), soit 0,24%, pour la période 2006-2009 (De Oliveira *et al.*, 2017). Toutefois ce taux de positivité est inférieur à 4,3% acquis par Vergne *et al.* (2003) en 2001 et à 0,8% par Villabona-Arenas *et al.* (2015). Cette divergence des résultats serait liée à la différence des peptides VIH-1/O recherchés et à la diminution générale de la séroprévalence du VIH-1/O constatée entre les différentes périodes étudiées. Contrairement aux résultats sus-présentés, la double réactivité M+O a augmenté avec le temps, passant de 0,1% à 2,1% ; cette augmentation est devenue significative à partir de 2013. Néanmoins, ces doubles réactivités étant quasiment inexistantes dans l'EDS-2011, on peut penser qu'elles restent globalement faibles au Cameroun. Leurs proportions semblent varier en fonction des années d'étude, de l'échantillon analysé, et surtout des outils de sérotypage utilisés, qui eux peuvent conduire à des réactivités croisées importantes.

Un échantillon du présent travail a présenté une réactivité avec le peptide VIH-1/N au taux de 0,04%. Ce résultat n'est pas étonnant puisque, jusqu'à présent, environ une vingtaine seulement de variants VIH-1/N ont été décrits (Simon *et al.*, 1998; Roques *et al.*, 2004; Yamaguchi *et al.*, 2006b; Vallari *et al.*, 2010; Delaugerre *et al.*, 2011). Le VIH-2 quant à lui a été diagnostiqué au taux de 0,08%. Aucune de ces deux souches virales n'a été retrouvée dans l'EDS-2011 ; ce qui témoigne bien de leur rareté. Le fait qu'aucun cas de VIH-1/P non plus n'ait été trouvé dans les deux sous-populations étudiées montre aussi leur extrême rareté. En effet, depuis la découverte de ce variant, seuls deux cas d'infection ont été détectés (J.-C. Plantier *et al.*, 2009; Vallari *et al.*, 2011). L'étude récente d'Alessandri-Gradt *et al.* (2018) sur 10831 échantillons de plasmas, dont 405 ont été collectés au Cameroun, a permis de conclure que ce variant issu de la transmission inter-espèces gorilles/homme s'adapte difficilement à chez l'espèce humaine (Alessandri-Gradt *et al.*, 2018).

Une proportion de 3,4% d'échantillons n'a donné aucune réactivité avec tous les peptides recherchés en routine au CPC ; ils ont alors été classés comme sérotype indéterminé. Dans l'EDS-2011, seuls 0,7% des échantillons ont présenté ce profil. Ces deux proportions sont inférieures à la valeur 8,4% rendue par Villabona-Arenas *et al.* (2015) mais, similaires ou proches de 3% trouvée par Vessière *et al.* (2010) qui ont utilisé la même méthodologie d'analyses. Nos échantillons dits de sérotype indéterminée peuvent avoir un faible titre d'anticorps ou correspondre à des cas de primo-infections ou au stade Sida, pour lequel le test de sérotypage est moins sensible.

IV.2. Caractérisation des variants non VIH-1/M

Sur les 24449 échantillons de plasmas VIH positifs des patients reçus en routine au CPC, le sérotypage a montré que 190 (0,8%) étaient VIH-1 non M, 119 (0,5%) VIH-1/O, 70 (0,3%) VIH-1/M+O, 1 (0,004%) VIH-1/N et 8 (0,03%) VIH-2. Des 673 échantillons de DBS VIH positifs de l'EDS, seuls quatre (0,6%) ont été révélés mono-réactifs VIH-1/O. Pour les mono-réactivités VIH-1/O et les doubles réactivités VIH-1/M+O, la détection des doubles infections et des formes recombinantes a été faite à partir des (RT-) PCRs spécifiques de groupes VIH-1/M et VIH-1/O dans les régions protéase, transcriptase-inverse et intégrase du gène de la polymérase et dans la région gp41 du gène de l'enveloppe. On a ainsi confirmé d'une part les résultats sérologiques obtenus avec la sérotypie dans la région *Env* et mis en évidence d'autre part, les discordances *pol/env*, et/ou avec le sérotypage qui ont permis de suspecter la présence d'un recombinant.

Des 189 échantillons mono-réactifs O ou doubles réactifs M+O obtenues en sérotypie au cours de ce travail, seuls 40 (21,2%) ont été analysés par biologie moléculaire parmi lesquelles 30 mono-réactifs VIH-1/O et 10 doubles réactifs VIH-1M+O. Parmi ces 30 échantillons VIH-1/O, 29 ont été conclus VIH-1/O par les PCRs réalisées sur les quatre régions ; le dernier échantillon a été positif pour le VIH-1/M uniquement dans les régions protéase et intégrase de la *Pol*, tandis que les RT-PCRs spécifiques VIH-1/O n'ont été positives que dans la région transcriptase inverse de la *Pol* et la gp41 du gène *Env*. Ces résultats suggèrent la présence d'un virus recombinant isolé VIH-1/MO chez le patient. Il est démontré que le point chaud des recombinaisons des VIH se situe au niveau du gène *vpr* (Peeters *et al.*, 1999; Takehisa *et al.*, 1999; Vessiere *et al.*, 2010a). Nos résultats laissent penser à la présence d'au moins 4 points de cassure sur le génome viral de ce patient : deux dans le gène de la *pol*, un dans la *vpr* et un dans la gp41. Récemment, Ngoupo *et al.* (2016) ont aussi observé une similarité de transmission de recombinants isolés au sein d'un couple ; ce virus a présenté en plus d'un point

de cassure dans la *vpr* deux autres dans la LTR. De Oliveira *et al.* (2017) viennent également de caractériser deux formes recombinantes ; ils ont montré un point de cassure au niveau du gène *vpr* associé à une cassure dans les régions LTR pour l'un et un point de cassure au niveau du gène *vpu* accompagné d'un autre à la fin de la gp41.

Par ailleurs, des 10 échantillons révélés VIH-1/M+O dans cette collecte en sérotypie, 6 (60%) étaient VIH-1/M, 2 (20%) VIH-1/O et 2 autres (20%) VIH-1/M+O. Les deux VIH-1/M+O obtenus laissent penser pour l'un à la présence d'au moins deux virus dont une forme recombinante VIH-1/MO et pour l'autre à la présence d'au moins deux virus suggérant une coinfection VIH-1/M+O. ce résultat se rapproche de celui de Villabona-Arenas *et al.* (2018), qui ont trouvé 73% de mono-infections VIH-1/M, 9,6% de mono-infections VIH-1/O et 11,5% de doubles infections. Par contre, nos résultats s'écartent suffisamment de ceux de De Oliveira *et al.* (2017) qui ont, avec la même méthodologie, confirmé une double infection chez 23% des échantillons, des mono-infections VIH-1/O et VIH-1/M respectivement chez 59% et 15% d'échantillons. Malgré les différences de proportions observées, il apparaît toutefois que le sérotypage conduit à des réactions croisées non spécifiques, qui doivent être confirmées avec des outils moléculaires avant de conclure à une réelle double infection.

Globalement, sur les 40 échantillons caractérisés, l'analyse moléculaire a mis en évidence une majorité d'infections VIH-1/O (31/40 ; 77,5%), 15% (6/40) d'infections VIH-1/M et, au final, trois échantillons (7,5%) respectivement en faveur d'une double infection VIH-1/M+O, d'un recombinant VIH-1/MO avec présence d'une souche parentale VIH-1/M, et d'un recombinant VIH-1/MO « isolé ». Les analyses phylogénétiques faites sur les variants VIH-1/O obtenus sur les 40 échantillons caractérisés ont indiqué que 25 d'entre-eux étaient des souches H et 6 des souches T. Ce résultat montre la prédominance des souches H au sein des VIH-1/O au Cameroun, observation déjà faite par Leoz *et al.* (2015) sur 190 patients parmi lesquels 87 provenaient du Cameroun. L'analyse moléculaire a de façon inattendue permis d'identifier un recombinant VIH-1/MO parmi les échantillons mono-réactifs VIH-1/O. En effet, les RT-PCRs ont montré que cet échantillon était VIH-1/O en gp41, résultat concordant avec la sérotypie.

Les doubles réactivités sérologiques non confirmées en PCR (8/10 cas) mettent en exergue la complexité du dépistage des doubles infections du fait, dans certains cas, d'un manque de spécificité du sérotypage. Les tests moléculaires ne pouvant pas être réalisés pour tous les échantillons VIH positifs du fait de leurs difficultés de réalisation et de leur coût, le sérotypage reste l'outil de choix pour déterminer les différents variants d'un grand nombre d'échantillons. Le nombre limité de doubles réactivités (0,3% dans le présent travail) peut par la suite être exploré.

Pour les échantillons collectés au cours de l'EDS, les quatre mono-réactivités VIH-1/O en sérotypie (0,6%) ont tous été confirmées avec les analyses moléculaires. L'arbre phylogénétique construit par la suite a montré que tous ces O sont des souches H. Ce résultat confirme (1) la prédominance des souches H chez les variants O, comme décrit par Leoz *et al.* (2015), et (2) la faible circulation des doubles infections. Enfin, si l'on s'intéresse à la provenance des quatre patients infectés par ce variant, on réalise que deux sont originaires du Centre et les deux autres du grand Nord, ce qui laisse penser que ce variant est concentré dans ces régions.

Le variant VIH-1/N trouvé dans cette étude en sérotypie a, quant à lui, été confirmé par des RT-PCRs non spécifiques dans la région IN du gène *pol* et la gp41 du gène *env*. Les analyses phylogénétiques réalisées ont aussi montré qu'il s'agit d'un variant VIH-1/N. C'est le vingtième cas de VIH-1/N décrit jusqu'à présent et tous, exception faite d'un seul cas, chez les patients d'origine camerounaise. Il forme un cluster avec les autres souches de VIH-1/N et est très proche de la souche YBF106 sur le gène de la polymérase mais assez éloigné sur l'enveloppe. Cette forte variabilité génétique entre les deux souches au niveau de l'enveloppe pourrait être due à la pression des systèmes immunitaires des différents hôtes de ces virus qui conduisent à différentes variations du génome viral dans la région de l'enveloppe, comparativement aux autres régions du génome de ces virus. La souche YBF106 a été décrite en 2004 chez un homme de 56 ans décédé quelque temps après la collecte de son échantillon de sang ; alors que le N décrit dans ce présent travail est une souche obtenue chez une patiente camerounaise vivant dans la région du centre et dont le mari est décédé 6ans avant son dépistage au CPC en 2014. Il est donc à ce stade de l'analyse très difficile de confirmer le probable lien épidémiologique entre les différents variants chez les deux patients. Néanmoins la découverte de ce nouveau variant VIH-1/N chez une patiente camerounaise résidente au Cameroun confirme une fois de plus la restriction de ce variant dans ce pays. D'autres auteurs ont montré que le VIH-1/N a une capacité répliquative similaire à celle des VIH-1/M (Tagnouokam Ngoupo *et al.*, 2018) ; le manque de diffusion de ce variant est probablement multifactoriel. Cependant, il convient de noter que ce groupe est l'un des plus récents VIH découvert en 1963 chez l'homme par rapport aux groupes de VIH-1/M qui lui a été isolé pour la première fois en 1908 et O en 1930 (Wertheim *et al.*, 2009) ; par conséquent, nous ne disposons d'aucune information sur le fait que le VIH-1/N soit encore en cours d'adaptation à l'espèce humaine ou non. Il n'est donc pas à exclure l'hypothèse de circulation à bas bruit du VIH-1/N au Cameroun, du fait des réactivités croisées pouvant exister avec le VIH-1/M en sérologie. Il est démontré au niveau

phylogénétique une position équidistante entre les VIH-1/M et le SIVcpz-gab dans les régions *gag* et *pol* ; toutefois les régions LTR et *env* sont plus proches du SIVcpz-gab (Simon *et al.*, 1998). Il est donc nécessaire de contrôler l'évolution de ce variant dans notre pays.

Les VIH-2 ont été retrouvés à une proportion très faible durant les 7ans de diagnostic de routine et pas du tout en population générale camerounaise. Dans la première sous-population 8 patients ont été déclarés positifs au VIH-2 (0,08%). Parmi ces échantillons, 4 (50%) ont été conclus positifs en PCR et l'autre moitié négative. L'arbre phylogénétique a permis de montrer que parmi les 4 échantillons positifs, 2 sont des VIH-2/A et 2 des VIH-2/B. Ce résultat indique que le variant VIH-2 reste très sporadique au Cameroun en particulier et en Afrique Centrale en général. Ce variant est plus répandu en Afrique de l'ouest (Ayoub *et al.*, 2013). Les 8 cas de VIH-2 observés dans cette étude proviennent tous d'adultes de plus de 30 ans et pour la plupart des femmes. Ayoub *et al.* (2013) a montré que ce type viral est caractérisé par des taux très bas de transmission hétérosexuelle et de transmission de la mère à l'enfant par rapport au VIH-1 (1% contre 30% pour VIH-1). Le VIH-2 est aussi connu pour sa faible fitness et son évolution assez lente vers le stade SIDA, ce qui expliquerait une proportion d'amplification négative de 50% obtenue en PCR.

IV.3. Détermination du profil de résistance et de la fréquence de détection des différentes mutations de résistance du VIH circulant au Cameroun

Depuis la découverte du VIH, des efforts sont consentis dans le monde afin de stopper cette pandémie. Malgré de nombreux progrès réalisés dans le cadre du diagnostic et du suivi des patients infectés par ce virus, le monde fait face à l'émergence de la résistance de ce dernier aux ARVs. Certains chercheurs ont qualifié cette situation de quatrième phase de l'épidémie à VIH (Laborde-Balen *et al.*, 2018). Le Cameroun caractérisé par une grande diversité des VIH circulants n'est pas en reste face à cette nouvelle menace, à cause des différentes difficultés rencontrées dans le traitement et le suivi des patients infectés telles que : l'absence ou la restriction de certains protocoles de traitement, la mauvaise observance des patients, le regard culturel sur cette affection (Billong *et al.*, 2012; Fokam *et al.*, 2013) qui favorisent l'émergence de la résistance du VIH aux ARVs. Le test par excellence couramment utilisé pour la détermination de ces résistances du VIH aux ARVs est le test génotypique de résistance. Plusieurs études ont déjà été menées au Cameroun sur la résistance aux ARVs, notamment celle qui a montré un taux de résistance assez élevé (80%) du VIH pour les INTI comparativement à celui obtenu pour les IP (19%) dans la ville de Douala chez des patients en échec de traitement

suivis dans un centre privé (Charpentier *et al.*, 2011). Ceccarelli *et al.* (2012) ont aussi conduit des travaux dans la ville de Yaoundé ; ils ont montré une faible transmission de résistance chez les patients naïfs au traitement (8,2%) comparativement au taux de 80% observé chez les patients mis sous traitement et en échec thérapeutique. La plupart de ces études ont été menées en zone urbaine, le plus souvent dans les villes de Yaoundé et Douala ; cette réalité ne donne pas un aperçu des mutations de résistance circulant et des molécules auxquelles le VIH résiste le plus dans tout le pays.

Dans le cadre de la présente étude, deux sous-populations, à savoir les plasmas des patients reçus en routine au CPC pour un test de résistance du VIH aux ARVs et les DBS conclus VIH positifs au cours de l'EDS de 2011 ont été utilisées. Suivant les recommandations de OMS sur le suivi dans les pays à ressources limitées tels que le Cameroun, le test de résistance du VIH aux ARVs doit être fait avant changement du protocole de traitement d'un patient en échec thérapeutique ; l'échec thérapeutique est déclarée chez un sujet lorsque la CV reste $> 3\log$ (1000 copies/mL) après une année de traitement bien conduit chez ce dernier (WHO, 2013). Par ailleurs, d'après les informations obtenus des questionnaires remplis par les personnes ayant participé à l'EDS-2011, la plupart des personnes infectées par le VIH enregistrées dans cette enquête ne connaissaient pas leur statut sérologique au VIH ; par conséquent, elles n'étaient pas sous traitement du VIH aux ARVs (INS-Cameroun, 2012). Ainsi, dans la présente étude la sous-population constituée des plasmas des patients venus au CPC pour un test de résistance du VIH aux ARVs a été considérée comme échantillon de malades en échec de traitement ; la deuxième sous-population quant à elle, constituée des DBS conclus VIH positifs au cours de l'EDS, a été considérée comme échantillon de patients naïfs au traitement. Le but premier de cette partie était donc de déterminer le profil de résistance et la fréquence de détection des différentes mutations de résistance du VIH circulant chez les patients en échec de traitement au Cameroun par le biais des patients reçus au CPC depuis 2013 (date implémentation de ce test génotypique de résistance comme analyse de routine à la disposition des patients au CPC) ; le second but était de déterminer le profil de résistance et la fréquence de détection des différentes mutations de résistance du VIH circulant chez les patients naïfs au traitement du VIH aux ARVs au Cameroun grâce aux échantillons conclus VIH positifs au cours de l'EDS 2011.

Profil de résistance et fréquence de détection des différentes mutations de résistances du VIH circulant chez les patients en échec de traitement au Cameroun

D'août 2013 à décembre 2016, 295 patients ont été reçus au CPC pour un test de résistance de routine du VIH aux ARVs ; 68,8% d'entre-eux ont eu une charge virale plasmatique supérieure à 3log copies/mL, et seulement 7,5% ont eu une charge virale inférieure à 3log copies/mL. Depuis 2013, la CV a été adoptée comme meilleur marqueur d'identification d'échec de traitement aux ARVs par l'OMS. Si cette dernière est inférieure à 3log copies/mL après six mois de traitement, le protocole de traitement du patient doit être maintenu ; si par contre elle reste supérieure à 3log copies/mL, l'observance doit être renforcée chez ce patient. Si six mois après le renforcement de l'observance la CV reste supérieure à 3log copies/mL, le patient est déclaré en échec de traitement et un test de résistance du VIH aux ARVs doit être réalisé afin de changer efficacement son protocole de traitement (Hirnschall *et al.*, 2013; WHO, 2013). Nos résultats suggèrent que la plupart des patients reçus, soit 90,2% (202/225) des patients possédant des informations sur le protocole de traitement qui leur était administré, étaient en échec thérapeutique de traitement. La durée médiane du traitement a été de 4 ans. Certaines molécules, à l'exemple de la Lamivudine, ont une très faible barrière génétique ; face à une exposition prolongée à la pression du virus, elles perdent leur efficacité et permettent au virus de devenir résistant (Van Laethem *et al.*, 2007; Delaugerre, 2010). La moitié des patients reçus (51,2%) étaient en première ligne de traitement et 18,3 % en deuxième ligne. Près d'un tiers (30,5%) des patients ne disposaient pas d'informations sur les molécules qui leur étaient administrées. Ce résultat montre l'une des faiblesses de notre système de santé, qui pourrait contribuer à un mauvais taux d'observance enregistré dans notre pays. Des études antérieures réalisées en 2013 au Cameroun ont relevé une adhérence médiocre des patients au traitement, avec une interruption du traitement et de beaucoup de perdus de vue des patients VIH positifs sous traitement (Meresse *et al.*, 2013; Pefura-Yone *et al.*, 2013). L'observance des patients est un gros problème au Cameroun en particulier et en Afrique noire en général du fait des facteurs locaux tels que : la situation géographique éloignée autour des centres de traitement, l'indisponibilité des moyens de transport, l'inefficacité des décentralisations des centres de suivi.

Le séquençage des gènes protéase et transcriptase inverse obtenus a montré que ces patients étaient pour la plupart infectés par des virus VIH-1/M du sous-groupe non B comprenant six sous-groupes (A, C, D, F, G et H), trois formes recombinantes circulantes (CRF02_AG, CRF01_AE et CRF_11-cpx) et deux VIH-1/O. Ces résultats corroborent ceux

d'une étude précédente qui a indiqué qu'environ 90% des individus infectés par le VIH-1 en Afrique subsaharienne le sont par des sous-types non-B (Hemelaar *et al.*, 2011). La prédominance des CRF02_AG (74,6%) renforce l'idée que le Cameroun en particulier et l'Afrique centrale en général sont reconnus avoir des prévalences de CRF02_AG supérieures à de 60% (Nyambi *et al.*, 2002; Torimiro *et al.*, 2009).

Concernant la résistance du virus aux INTI, une prédominance de la mutation M184V/I à 75,3% a été détectée, suivie de la T215Y/F/C à 29,8%. La présence de la mutation M184V/I entraîne une résistance directe à la 3TC et FTC et une baisse de sensibilité au ddI et à l'ABC ; tandis que la mutation T215Y confère une résistance directe à l'AZT et au d4T (Wensing *et al.*, 2014). La Lamivudine est l'une des molécules les plus utilisées en première et seconde lignes de traitement au Cameroun pour le suivi des patients infectés par le VIH (Organization, 2010; Hirschall *et al.*, 2013). Dans la présente étude, sur les 205 patients ayant des informations sur leur traitement, 199 (97,1%) ont été traités par le 3TC ; parmi eux, 152 (76,4%) ont été résistants. Ce résultat se rapproche de celui obtenu par Ceccarelli *et al.* (2012), qui ont trouvé une prédominance de la mutation M184V (77,2%) suivie par la T215F et T215Y à 24,5 et 22,7% respectivement chez les patients infectés par le VIH et mis sous traitement dans la ville de Yaoundé au Cameroun. Le taux de résistance élevé observé avec la 3TC est un mauvais pronostic pour le suivi des patients, notamment dans les milieux où le test de résistance du VIH aux ARVs n'est pas systématiquement pratiqué. En effet, il rappelle que la Lamivudine a une faible barrière génétique au VIH, ce qui favorise l'émergence rapide de la résistance de ce virus une fois exposé à cette molécule (Van Laethem *et al.*, 2007; Delaugerre, 2010). De même, la présence de TAMs (T215Y, K70R) et des mutations Q151M et M184V observées dans cette étude peuvent compromettre les options de traitement dans les pays à ressources limitées comme le Cameroun. Les patients avec une résistance à la 3TC et/ou à la AZT sur la première ligne de traitement sont difficiles à traiter en deuxième ligne, notamment à cause de la présence de peu de combinaisons de traitements dans nos pays, mais aussi à cause du coût du test de résistance qui reste très élevé et n'est pas subventionné. En outre, les options thérapeutiques de traitement en deuxième ligne sont aussi assez limitées car très peu des molécules recommandées pour cette ligne sont disponibles au Cameroun.

Dans la classe d'INTI, la résistance la moins observée a été celle à la Didanosine retrouvée chez 19% de nos patients. Parmi les 4 patients traités avec cette molécule, la moitié (2/4) en a été résistante. La résistance directe à la ddI est associée à la présence de l'une des mutations majeures suivantes : K65R, L74V et Q151M. Ces mutations ne sont pas courantes chez les sous-types non B du VIH-1 (Hawkins *et al.*, 2009). Une étude réalisée au Nigeria a

montré que les patients infectés par les sous-types CRF02_AG ou G étaient moins susceptibles de développer la mutation K65R (Wallis *et al.*, 2010). Dans notre étude, plus de 74% des patients reçus ont été infectés par le sous-type CRF02_AG ; ceci pourrait expliquer la faible expression de ces mutations et, par conséquent, le faible taux de résistance à la ddi. Il est connu que le TAMs et K65R ont des effets antagonistes sur la résistance aux INTI (Parikh *et al.*, 2006) ; par conséquent, la forte expression de TAMs (T215Y/F et K70R) observée dans la présente étude pourrait davantage empêcher l'expression de la mutation K65R.

Concernant les INNTI, les mutations majeures observées ont été la K103S/N/R (47,8%) suivie d'Y181C à 26,1%. Ces deux mutations confèrent une résistance croisée à l'Efavirenz et à la Névirapine (Wensing *et al.*, 2014). Ces données expliquent les taux de résistance élevés à 75,9 et 76,6% respectivement pour EFV et la NVP dans notre étude. La résistance croisée à ces médicaments a été aussi observée dans d'autres études menées au Cameroun (Ceccarelli *et al.*, 2012). Ces deux molécules sont couramment prescrites au Cameroun en 1ère ligne de traitement selon les lignes directrices nationales de prise en charge (MINSANTE, 2014). Toutefois, la plus faible résistance observée pour cette classe d'ARVs est celle à l'Etravirine (20,7%) en raison de l'absence de l'association des mutations Y181C + H22Y. Par conséquent, ETR peut être une meilleure option d'INNTI dans le contexte camerounais ; il est d'ailleurs proposé en 3^e ligne de traitement selon le guide de prise en charge au Cameroun.

Globalement, dans la TI, les mutations de résistance les plus identifiées sont la M184V (associée à la résistance aux INTI) et la K103N (associée à la résistance aux INNTI). Des résultats similaires ont été obtenus au Gabon, Nigeria et Afrique du Sud (Hamers *et al.*, 2012; Liegeois *et al.*, 2012; Hassan *et al.*, 2014). De nombreux travaux ont également révélé que la prévalence des mutations de résistance chez les patients en échec de première ligne de traitement en Afrique subsaharienne varie de 53 à 84 %, avec 38 à 64 % de résistance dans les deux classes (Marconi *et al.*, 2008; Hamers *et al.*, 2012; Liegeois *et al.*, 2012; Hassan *et al.*, 2014). Il est aussi connu d'une part que la présence de TAMs (M41L D67N, K70R, L210W, T215Y/F et K219Q/E) réduit la sensibilité du VIH à tous les INTI actuellement approuvés (Whitcomb *et al.*, 2003) et, d'autre part, que l'utilisation de certains inhibiteurs de la TI dépend du variant concerné. Environ 60% des VIH-1/O sont naturellement résistants aux INNTI à cause de l'existence de la mutation Y181C dans leur génome (Descamps *et al.*, 1997). Seul l'un des deux VIH-1/O mis en évidence dans notre étude a résisté à tous les INNTI, ce qui a confirmé l'hypothèse de Decamps *et al.* (1997) sur la répartition des variants O en deux groupes selon la présence ou l'absence de la Cystéine (C) à la place de la tyrosine (Y) en position 181. Des

remarques similaires pourraient être faites pour les virus recombinants VIH-1/M+O qui circulent au Cameroun (Takehisa *et al.*, 1999; Yamaguchi *et al.*, 2004; Depatureaux *et al.*, 2010; Ngoupo *et al.*, 2016). Dans ce pays, la présence des VIH-1/O, la circulation concomitante du VIH-1 M et O et l'utilisation continue du traitement de première ligne avec des options limitées avec 3TC, EFV et NVF rendent difficile le suivi des PVVIH infectés par ces variants rares.

Concernant les PIs, la seule résistance élevée est celle à la Tipranavir qui a été observée à 88,8% malgré le fait qu'aucun des patients n'a été traité avec cette molécule. Certaines études suggèrent que les VIH-1/M sous-types non B, principalement les CRF02-AG, ont un polymorphisme naturel dans les gènes protéase et transcriptase inverse (Vergne *et al.*, 2000) ; parmi les mutations associées à la résistance à cette molécule, cinq positions (35, 36, 61, 69, et 89) sont fréquemment représentées de façon significative chez les VIH-1/M sous type non-B (Marcelin *et al.*, 2008). Nos résultats ont souligné la prédominance des mutations M36I/L, H69K/N et L89M à 96,6, 94,6 et 92,9%, respectivement. Quatre de ces cinq mutations ont été responsables de la résistance à la TPV observée. Cette donnée est en accord avec les travaux d'Abecassis *et al.* (2006) et de Poveda *et al.* (2008), qui ont établi que les sous-types CRF02_AG sont moins sensibles au Tipranavir (Abecassis *et al.*, 2006; Poveda *et al.*, 2008). En effet, tous les patients infectés par les CRF02_AG dans cette étude sont naturellement résistants aux TPVs. Heureusement, le Tipranavir n'est pas utilisé au Cameroun, ni inclus dans les options de traitement alternatif. Par contre, concernant la Lopinavir qui est la principale molécule de deuxième ligne utilisée au Cameroun, 6,4% des patients reçus y ont résisté. Cette résistance à la LPV est favorisée par l'apparition des mutations I47A et L76V qui confèrent une résistance directe à cette molécule. Par ailleurs, la résistance la moins observée à cette classe des ARVs est celle à la Darunavir (environ 1%). La DRV est reconnue pour sa grande efficacité chez tous les sous-types du VIH (Poveda *et al.*, 2008). Aucun patient n'est traité avec la Darunavir dans notre sous-population d'étude. Cette molécule est recommandée pour le traitement de troisième ligne d'après les directives nationales de traitement mises en application au Cameroun depuis 2014 (MINSANTE, 2014).

Les schémas thérapeutiques antirétroviraux utilisés pour le traitement des patients en première ligne sont 3TC + TDF + EFV (70,2%), 3TC + AZT + NVP (27,8%) et 3TC + d4T + NVP (2%). Pour le traitement de deuxième ligne, la Lopinavir est le seul inhibiteur de protéase retrouvé en combinaison avec 3TC + TDF à 57,4%, 3TC + AZT à 31,5% et ABC + ddI à 11,1%. L'observation faite sur ces neuf molécules identifiées a montré une augmentation significative du nombre de patients traités par le Ténofovir. De 33,3% de patients mis sous Ténofovir en

2013, on est passé à 74,7% de patients mis sous TDF en 2016. Depuis 2013, l'OMS a placé le TDF comme molécule préférentielle de première et deuxième lignes de traitement dans les pays à ressources limitées ; ces recommandations ont été implémentées au Cameroun dès 2014 (WHO, 2013; MINSANTE, 2014). L'augmentation du nombre de patients mis sous Ténofovir observée dans la présente étude en est la confirmation. Cependant, une augmentation significative de la résistance du virus au Ténofovir a aussi été constatée chez ces patients à partir de 2014 (21,7%) à 2016 (47,7%). Une méta-analyse réalisée en 2016 a révélé qu'entre 20 et 60% des individus en échec de traitement contenant le Ténofovir sont susceptibles de développer une résistance au TDF, induite par l'apparition des mutations primaires K65R/N et/ou K70E/G/Q (Group., 2016). Sur les quatre années de notre étude, 68,8% (203/295) des patients ont connu un échec thérapeutique. Parmi eux, 137 (66,8 %) avaient le TDF dans leur combinaison de trithérapie et 50 (36,5%) en ont résisté. Cette résistance au TDF a été principalement observée chez les patients en première ligne de traitement. Les résistances majeures au TDF sont causées par l'apparition des mutations primaires K65R/E ou K70E, ou en présence d'une association d'au moins quatre mutations parmi les suivantes M41L, E44D, D67N, T69D/N/S, L74V/I, L210W, et T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F) (ANRS, 2015). Dans la présente étude, la mutation la plus courante décrite chez les patients résistants au TDF est la K65R/E (51%), qui est normalement rare chez les sous-types CRF02_AG (Wallis *et al.*, 2010). Ce résultat avoisine ceux obtenus au Kenya et en Afrique du Sud, où l'expression de la mutation K65R a atteint des valeurs de 69% et 59.5% respectivement (Skhosana *et al.*, 2015; Brooks *et al.*, 2016). Dans ces travaux, les sous-types A au Kenya et en Afrique du Sud ont été dominants. Il est connu qu'en cas d'échec de traitement contenant le Ténofovir, l'apparition de la mutation K65R/E diminue la sensibilité à tous les INTI, sauf à la Zidovudine ; elle varie aussi avec le sous-type et la région géographique (Gupta *et al.*, 2005; Hawkins *et al.*, 2009; Skhosana *et al.*, 2015). L'exposition des patients à une mauvaise combinaison d'ARVs (indiquée par une charge virale élevée) pendant une longue période peut donc conduire à une augmentation de la résistance au Ténofovir (Gupta *et al.*, 2009; Group., 2016). La principale limite de cette étude pourrait être son caractère transversal ; on ne dispose d'aucune information sur l'état de la résistance au début du traitement chez ces patients, ni même de données sur l'observance de cette sous-population au traitement. Il devient ainsi difficile de justifier clairement l'augmentation de la résistance au Ténofovir avec le temps. On sait néanmoins qu'une mauvaise rétention permanente aux ARVs couplée à une faible adhérence au traitement et à des ruptures de stock en médicaments sont des facteurs majeurs favorisant l'émergence des résistances du VIH aux ARVs (Billong *et al.*, 2016; Fonsah *et al.*, 2017). Au Cameroun, seuls 10,71% des

patients d'un seul centre de traitement et d'une seule région (littoral) ont eu des performances acceptables de rétention des patients sur 12 mois (Billong *et al.*, 2016). Ce qui suppose qu'environ 90% des patients des régions du Cameroun ont des risques élevés de pharmacorésistance du VIH en raison de la mauvaise rétention des traitements antirétroviraux.

Au sein de notre sous-population d'étude, la durée médiane de traitement a été de 5 ans (de 2 à 8 ans), et une association positive entre la résistance au Ténofovir et la durée du traitement, chez les patients traités par ce médicament depuis un et deux ans, a aussi été aperçue. La recommandation de l'OMS (2013) a été mise en application au Cameroun dès 2014, par conséquent il est possible que la proportion de patients ayant le Ténofovir dans leur protocole de traitement avant 2014 soit très faible. Cette hypothèse peut expliquer le fait que nous n'avons pas d'association significative entre la mise sous Ténofovir et la durée du traitement après 2 ans; ce qui pourrait aussi appuyer l'hypothèse de la mise des patients en échec de traitement longtemps sous TDF. En outre, nous avons constaté une association significative entre les combinaisons « TDF + 3TC + EFV » et l'apparition de la résistance au TDF. Toutes ces observations montrent qu'avec le temps il est possible que la résistance au Ténofovir devienne comme celle actuellement observée à la Lamivudine. L'exposition prolongée des patients au mauvais schéma thérapeutique peut entraîner l'apparition de la mutation K65R/E, qui est rarement relevée chez les personnes subissant une surveillance virologique fréquente et chez lesquelles la thérapie a changé quand l'échec virologique a été détecté (Rhee *et al.*, 2017).

Une augmentation non significative de la résistance au TDF a été observée au fil du temps chez les patients non traités par cette molécule: 14,3% en 2014 à 27,3% en 2016. Cette résistance a été notée chez les patients en échec thérapeutique de première ligne. Il a été précédemment montré que l'augmentation du nombre de patients mis sous traitement et en échec virologique accroît la possibilité de l'émergence de la pharmacorésistance, en raison de la transmission de souches résistantes (Kantor *et al.*, 2004). Cette hypothèse de la transmission des souches résistantes aux patients naïfs au traitement dans la population camerounaise est possible. Si la charge virale des patients est bien contrôlée, Il est possible de limiter cette transmission (Gupta *et al.*, 2009).

Profil de résistance et fréquence de détection des différentes mutations de résistance du VIH circulant chez les patients naïfs au traitement au Cameroun

La résistance chez les patients naïfs au traitement a été recherchée sur les 673 échantillons VIH positifs, collectés au cours de l'EDS 2011. Les différentes PCRs réalisées sur

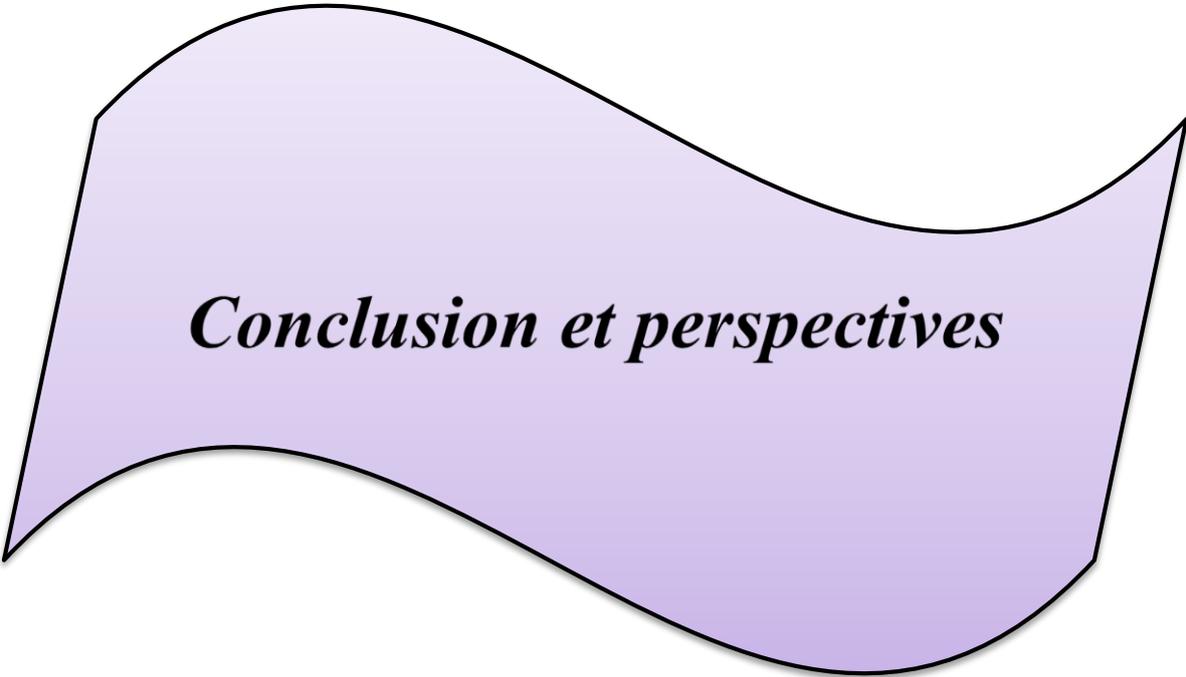
les deux régions d'intérêt pour le traitement au Cameroun (protéase et transcriptase inverse) ont permis une amplification positive chez 43,3% des DBS analysés, une amplification en PR ou TI uniquement chez 10% et 8,8% respectivement chez des DBS analysés. Le pourcentage élevé (37,7%) d'échecs d'amplification sur ces deux régions pourrait être dû à une longue conservation pendant près de 7 ans de ces DBS à -80°C. Ils ont subi plusieurs phases de congélation et décongélation pour des analyses sur d'autres projets de recherche au sein de notre laboratoire. McNulty *et al.* (2007) rapportent que la température de conservation des prélèvements de sang séchés sur papier buvard serait un élément très important pour une amplification optimale de ces échantillons en PCRs. Pour le test de résistance, la température la plus appropriée pour une conservation sur plusieurs années serait de -20°C (McNulty *et al.*, 2007).

Le séquençage des amplicons obtenus a eu un taux de réussite d'environ 54,4% (160 DBS sur 294) sur les deux régions ; le pourcentage d'échec de séquençage sur les deux régions, soit 31%, pourrait être dû au conditionnement (conservation et transport) des amplicons de notre laboratoire à celui du CHU de Rouen ; il n'est pas exclu qu'une faible quantité d'ADN soit présente dans les amplicons obtenus. Les analyses phylogénétiques effectuées chez ces échantillons ont permis d'observer une prédominance des VIH-1/M de sous-types non B avec une dominance des CRF02_AG à 62,5%, suivie par le sous type A (10,6%). Ces résultats confirment la présence majoritaire des CRF02_AG au Cameroun, ce qui est en accord avec ceux obtenus dans d'autres études réalisées au Cameroun sur la résistance du VIH aux ARVs (Nyambi *et al.*, 2002; Torimiro *et al.*, 2009; Hemelaar *et al.*, 2011). Deux des quatre VIH-1/O obtenus au sein de cette population ont pu être séquencés ; cette analyse a montré qu'il s'agissait des sous-types H.

Une très faible expression des mutations conférant des résistances a été observée au sein de la population générale camerounaise. Chez les INTI, parmi les quelques mutations décrites, la M184V/I a prédominé à 5,6%, suivie par la T215D/I/V à 5%. Ces deux mutations primaires entraînent une résistance majeure à la Lamivudine et la Zidivudine et la Stavudine. La résistance à la Lamivudine est l'une des plus observées chez les patients ayant une combinaison d'ARVs incluant cette molécule et en échec de traitement. Il a déjà été mentionné plus haut que cette molécule a une très faible barrière génétique et qu'une exposition prolongée à cette dernière favorise la survenue de la résistance (Van Laethem *et al.*, 2007; Delaugerre, 2010). La Stavudine quant à elle a été au cours des 10 dernières années parmi les molécules les plus administrées aux patients pour le traitement de première et deuxième lignes au Cameroun; c'est seulement depuis 2014 que cette molécule a été remplacée par le Tenofovir à cause de sa

toxicité et de sa mauvaise tolérance par les patients (Bender *et al.*, 2010; WHO, 2013). La collecte des échantillons de l'EDS ayant été faite en 2011, la prédominance de la résistance à la Stavudine pourrait être due à une grande ou longue exposition de ces patients à cette molécule par rapport aux autres ARVs disponibles à cette époque. Concernant les INNTI, les mutations les plus exprimées sont la V90I et V179I/D à 3,1% (5 individus sur 160) chacun. Ces mutations confèrent une résistance majeure à la Rilpivirine (8,1%). Chez les inhibiteurs de protéase, une forte expression de la mutation M36I/L à 97,5% (156/160) a été observée, suivie par les mutations H69K/N/R/Q et L89M/I/V à 96,3% (154/160) et 95% (152/158) respectivement. D'après l'algorithme de l'ANRS sur les résistances aux ARVs, ces mutations accessoires entraînent une résistance mineure au Tipranavir. Les mutations mineures qui confèrent la résistance au Tipranavir sont sélectionnées par d'autres ARVs de cette classe chez les patients prétraités ; ceci peut conduire à des résistances croisées dans cette classe d'ARV (Baxter *et al.*, 2006).

De manière générale, sur les deux sous-populations utilisées pour l'étude des résistances, une forte résistance aux ARVs chez les patients en échec thérapeutique au Cameroun et une faible résistance des virus archivés au sein des patients pour la plupart naïfs au traitement ont été observées. Il est connu qu'il n'y a pas de différence entre les résultats de résistance obtenus sur les plasmas et ceux obtenus à partir des DBS (Masciotra *et al.*, 2007). La grosse contradiction perçue dans ce travail pourrait venir de ce que les patients reçus en routine ont, pour la plupart, été en échec de traitement et ce depuis plusieurs années contrairement à ceux de l'EDS qui sont naïfs au traitement. Les principales difficultés et limites avec les patients infectés par le VIH dans le cadre de l'EDS sont le fait qu'on ne dispose pas de données cliniques sur ces patients. Ce manque d'informations rend très difficile les conclusions que l'on pourrait donner par rapport à cette sous population comparativement aux échantillons reçus en routine. Nous ne pouvons qu'émettre certaines hypothèses : (1) ces échantillons proviennent des patients en primo-infection, ce qui justifierait un pourcentage d'amplification de 62,3 % obtenu sur les PCR de génotypage ; (2) partant du principe qu'ils sont naïfs au traitement, la faible résistance du VIH aux ARVs observée dans cette sous-population suggère qu'au sein de la population camerounaise l'émergence de la résistance du VIH aux ARVs serait un problème de suivi des personnes mises sous traitement.



Conclusion et perspectives

En définitive nos résultats suggèrent que tous les types de VIH (1 et 2) et certains groupes de VIH-1 (M, N, O) circulent au Cameroun bien que sporadiquement pour VIH-1/O et très faiblement pour VIH-1/N et VIH-2. Les variants VIH-1/P quant à eux restent très rares dans ce pays. Le sérotypage demeure la technique de choix pour la détermination des types/groupes de VIH ; de plus il est important d'effectuer cette analyse sur tous les échantillons de sérologie positive au VIH afin de documenter les tendances potentielles des proportions relatives de ces différentes variants au Cameroun. Le dépistage des doubles infections et des recombinants M/O quant à lui apparaît complexe. La stratégie séro-moléculaire développée dans ce travail est utile mais ces outils doivent néanmoins être optimisés.

L'analyse des mono-réactivités VIH-1/O et doubles réactivités VIH-1/M+O permet l'identification de recombinants M/O et de doubles infections M+O ; elle montre l'intérêt d'explorer de tels échantillons. La recombinaison étant un processus dynamique, la caractérisation moléculaire de certaines portions des génomes viraux donne la possibilité d'avoir des points de recombinaison autres que dans la *vpr* fréquemment mis en évidence dans d'autres études. Il existe des formes recombinantes M/O plus complexes qui impliquent d'autres régions du génome, en particulier chez les patients avec des infections multiples. La caractérisation précise de ces recombinants M/O ne peut donc être faite qu'à travers le séquençage du génome complet. Le développement des stratégies multiplexes telles que les puces à ADN ou la technologie Luminex est nécessaire pour cribler un grand nombre de régions afin d'identifier de telles formes. Une surveillance régulière au Cameroun des proportions des différents variants de VIH, des doubles infections et formes recombinantes sur la base d'un algorithme séro-moléculaire est nécessaire pour améliorer la prise en charge des patients d'une part et pour suivre d'éventuelles émergences de CRF intergroupes d'autre part.

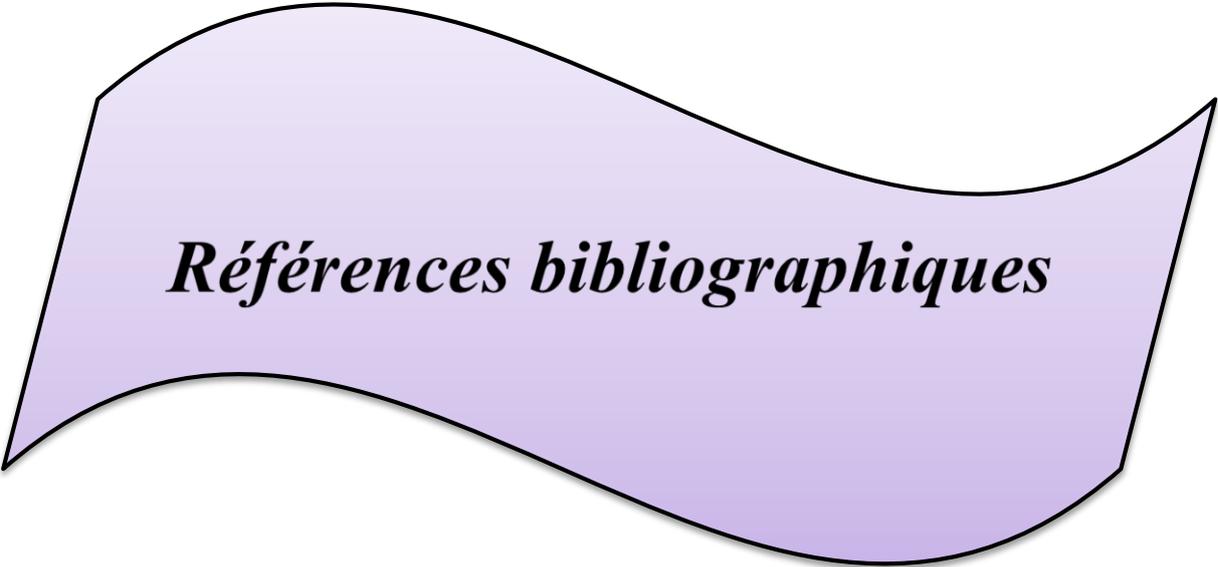
Cette grande diversité du VIH, observée dans notre pays, pose non seulement un gros problème dans le diagnostic mais aussi et surtout dans le suivi des patients particulièrement dans les pays où les options de prise en charge thérapeutique des patients restent très limitées. Ce travail montre une émergence de la résistance chez les patients en échec de traitement de première ligne, principalement avec des molécules telles que la Lamivudine, l'Efavirenz et la Névirapine. De plus la mise des patients sous Ténofovir, qui est actuellement la molécule par excellence de première et deuxième lignes de traitement, peut à long terme être source d'émergence de la résistance à cette molécule. Ce travail confirme l'impact de la pharmacorésistance du VIH dans l'optimisation du traitement contre le VIH. La détection précoce de la charge virale chez les patients mis sous traitement peut être un indicateur précoce de la résistance aux médicaments ; ce test effectué de manière systématique peut prédire la survenue

de la résistance. Il apparaît que la mise en routine des tests de résistance du VIH aux ARVs avant d'entamer le traitement des patients, régulièrement pendant le traitement, ou encore en cas d'échec de TARV et avant le changement de protocole de traitement, serait la meilleure option pour l'amélioration du suivi des patients. Cependant plusieurs facteurs sont susceptibles de contribuer à augmenter le risque de résistance du VIH aux ARVs dans les pays à ressources limitées tels que le nôtre. Parmi ces facteurs, il y a la non adhérence ou la mauvaise observance au médicament chez les patients sous traitement, le changement de protocole de TARV chez les patients parce que les molécules sont en rupture de stocks et la limitation des options de traitement pour les patients qui sont intolérants à certains molécules ou à cause de la diversité virale. Enfin, il est mis en évidence qu'au Cameroun, la deuxième génération INNTI (Etravirine) et les IP (Darunavir) ou encore l'arrivée des nouvelles molécules telles que Dolitégravir et Raltégravir dans les protocoles de traitements de premières et deuxième lignes, représentent des options prometteuses pour les patients avec des souches de VIH multirésistantes.

Pour finir, même si l'impact de la diversité des variants de VIH est connu sur les techniques de diagnostic, ses conséquences sur la réponse immuno-virologique avec les stratégies thérapeutiques actuelles restent à surveiller. Ceci est particulièrement important dans un contexte clinique moderne, qui tend à une prise en charge la plus adaptée possible au virus infectant, mais surtout au patient, à son observance et à sa qualité de vie. Il est indispensable d'identifier les infections atypiques telles que les variants rares (N, P, VIH-2), les doubles infections et recombinants, même si elles semblent mineurs sur le plan épidémiologique, pour éviter l'émergence de formes complexes multi-résistantes aux ARVs dès le départ. La nécessité pour l'OMS de renforcer la surveillance de la résistance primaire dans les pays à ressources limitées est un défi clé pour la surveillance de la transmission des variants mutants aux patients VIH nouvellement infectés. Cette surveillance est d'un grand intérêt, en particulier dans les régions avec une proportion élevée de patients sous échec de traitement à cause de la possibilité de transmission de souche résistants aux patients nouvellement infectés.

Pour des travaux futurs, nous envisageons de :

- Séquencer les génomes complets de tous les variants non VIH-1/M obtenus dans la présente étude;
- Rechercher la résistance archivée chez les patients en échecs de traitement.



Références bibliographiques

- Abecasis, A. B., Deforche, K., Bachelier, L. T., McKenna, P., Carvalho, A. P., Gomes, P., Vandamme, A. M., & Camacho, R. J. (2006). Investigation of baseline susceptibility to protease inhibitors in HIV-1 subtypes C, F, G and CRF02_AG. *Antiviral therapy*, *11*(5), 581-589.
- Abrahams, M. R., Anderson, J. A., Giorgi, E. E., Seoighe, C., Mlisana, K., Ping, L. H., Athreya, G. S., Treurnicht, F. K., Keele, B. F., Wood, N., Salazar-Gonzalez, J. F., Bhattacharya, T., Chu, H., Hoffman, I., Galvin, S., Mapanje, C., Kazembe, P., Thebus, R., Fiscus, S., Hide, W., Cohen, M. S., Karim, S. A., Haynes, B. F., Shaw, G. M., Hahn, B. H., Korber, B. T., Swanstrom, R., & Williamson, C. (2009). Quantitating the multiplicity of infection with human immunodeficiency virus type 1 subtype C reveals a non-poisson distribution of transmitted variants. *Journal of virology*, *83*(8), 3556-3567. doi:10.1128/jvi.02132-08
- Abram, M. E., Ferris, A. L., Shao, W., Alvord, W. G., & Hughes, S. H. (2010). Nature, position, and frequency of mutations made in a single cycle of HIV-1 replication. *Journal of virology*, *84*(19), 9864-9878. doi:10.1128/jvi.00915-10
- Aghokeng, A. F., Mpoudi-Ngole, E., Dimodi, H., Atem-Tambe, A., Tongo, M., Butel, C., Delaporte, E., & Peeters, M. (2009). 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*, *4*(11), e7702. doi:10.1371/journal.pone.0007702
- Agut, H., Candotti, D., Rabanel, B., Huraux, J. M., Remy, G., Ingrand, D., Tabary, T., Chippaux, C., Chamaret, S., Guetard, D., & et al. (1992). Isolation of atypical HIV-1-related retrovirus from AIDS patient. *Lancet*, *340*(8820), 681-682.
- Ahidjo Ayouba, P. M., Paul M.V. Martin,, Patrick Cunin, J. M., Bernadette Njinku,, & Sandrine Souquières, a. F. S. (2001). HIV-1 Group O Infection in Cameroon, 1986–1998. *Emerging infectious diseases*, *7*(3, May–June 2001), 466-467.
- Alessandri-Gradt, E., De Oliveira, F., Leoz, M., Lemee, V., Robertson, D. L., Feyertag, F., Ngoupo, P. A., Mauclere, P., Simon, F., & Plantier, J. C. (2018). HIV-1 group P infection: towards a dead-end infection? *Aids*, *32*(10), 1317-1322. doi:10.1097/qad.0000000000001791
- Alizon, M., Wain-Hobson, S., Montagnier, L., & Sonigo, P. (1986). Genetic variability of the AIDS virus: nucleotide sequence analysis of two isolates from African patients. *Cell*, *46*(1), 63-74.
- Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C. C., Feng, Y., Kennedy, P. E., Murphy, P. M., & Berger, E. A. (1996). CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science*, *272*(5270), 1955-1958.
- Alter, G., Malenfant, J. M., Delabre, R. M., Burgett, N. C., Yu, X. G., Lichterfeld, M., Zaunders, J., & Altfeld, M. (2004). Increased natural killer cell activity in viremic HIV-1 infection. *Journal of immunology*, *173*(8), 5305-5311.
- Andrews, S. M., & Rowland-Jones, S. (2017). Recent advances in understanding HIV evolution. *F1000Research*, *6*, 597. doi:10.12688/f1000research.10876.1
- ANRS. (2015). ANRS procedures: HIV-1. Accessed 27 December 2016. Available at: <http://www.hivfrenchresistance.org>

- ANRS. (2016). ANRS procedures HIV. Accessed 25 November 2017. Available from: <http://www.hivfrenchresistance.org>.
- Arien, K. K., Abraha, A., Quinones-Mateu, M. E., Kestens, L., Vanham, G., & Arts, E. J. (2005). The replicative fitness of primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M, HIV-1 group O, and HIV-2 isolates. *Journal of virology*, 79(14), 8979-8990. doi:10.1128/jvi.79.14.8979-8990.2005
- Asante-Appiah, E., & Skalka, A. M. (1997). A metal-induced conformational change and activation of HIV-1 integrase. *The Journal of biological chemistry*, 272(26), 16196-16205.
- Aulicino, P. C., Holmes, E. C., Rocco, C., Mangano, A., & Sen, L. (2007). Extremely rapid spread of human immunodeficiency virus type 1 BF recombinants in Argentina. *Journal of virology*, 81(1), 427-429. doi:10.1128/jvi.01403-06
- Autran, B., Carcelain, G., Li, T. S., Blanc, C., Mathez, D., Tubiana, R., Katlama, C., Debre, P., & Leibowitch, J. (1997). Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science*, 277(5322), 112-116.
- Ayoub, A., Akoua-Koffi, C., Calvignac-Spencer, S., Esteban, A., Locatelli, S., Li, H., Li, Y., Hahn, B. H., Delaporte, E., Leendertz, F. H., & Peeters, M. (2013). Evidence for continuing cross-species transmission of SIVsmm to humans: characterization of a new HIV-2 lineage in rural Cote d'Ivoire. *Aids*, 27(15), 2488-2491. doi:10.1097/01.aids.0000432443.22684.50
- Ayoub, A., Mauciere, P., Martin, P. M., Cunin, P., Mfoupouendoun, J., Njinku, B., Souquieres, S., & Simon, F. (2001). HIV-1 group O infection in Cameroon, 1986 to 1998. *Emerging infectious diseases*, 7(3), 466-467. doi:10.3201/eid0703.010321
- Ayoub, A., Souquieres, S., Njinku, B., Martin, P. M., Muller-Trutwin, M. C., Roques, P., Barre-Sinoussi, F., Mauciere, P., Simon, F., & Nerrienet, E. (2000). HIV-1 group N among HIV-1-seropositive individuals in Cameroon. *Aids*, 14(16), 2623-2625.
- Back, N. K., Nijhuis, M., Keulen, W., Boucher, C. A., Oude Essink, B. O., van Kuilenburg, A. B., van Gennip, A. H., & Berkhout, B. (1996). Reduced replication of 3TC-resistant HIV-1 variants in primary cells due to a processivity defect of the reverse transcriptase enzyme. *The EMBO journal*, 15(15), 4040-4049.
- Barin, F., Cazein, F., Lot, F., Pillonel, J., Brunet, S., Thierry, D., Damond, F., Brun-Vezinet, F., Desenclos, J. C., & Semaille, C. (2007). Prevalence of HIV-2 and HIV-1 group O infections among new HIV diagnoses in France: 2003-2006. *Aids*, 21(17), 2351-2353. doi:10.1097/QAD.0b013e3282f15637
- Barin, F., Lahbabi, Y., Buzelay, L., Lejeune, B., Baillou-Beaufils, A., Denis, F., Mathiot, C., M'Boup, S., Vithayasai, V., Dietrich, U., & Goudeau, A. (1996). Diversity of antibody binding to V3 peptides representing consensus sequences of HIV type 1 genotypes A to E: an approach for HIV type 1 serological subtyping. *AIDS research and human retroviruses*, 12(13), 1279-1289.
- Barin, F., M'Boup, S., Denis, F., Kanki, P., Allan, J. S., Lee, T. H., & Essex, M. (1985a). Serological evidence for virus related to simian T-lymphotropic retrovirus III in residents of west Africa. *Lancet*, 2(8469-70), 1387-1389.

- Barin, F., McLane, M. F., Allan, J. S., Lee, T. H., Gropman, J. E., & Essex, M. (1985b). Virus envelope protein of HTLV-III represents major target antigen for antibodies in AIDS patients. *Science*, 228(4703), 1094-1096.
- Barin, F., Plantier, J. C., Brand, D., Brunet, S., Moreau, A., Liandier, B., Thierry, D., Cazein, F., Lot, F., Semaille, C., & Desenclos, J. C. (2006). Human immunodeficiency virus serotyping on dried serum spots as a screening tool for the surveillance of the AIDS epidemic. *Journal of medical virology*, 78 Suppl 1, S13-18. doi:10.1002/jmv.20600
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., & Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220(4599), 868-871.
- Baxter, J. D., Schapiro, J. M., Boucher, C. A., Kohlbrenner, V. M., Hall, D. B., Scherer, J. R., & Mayers, D. L. (2006). Genotypic changes in human immunodeficiency virus type 1 protease associated with reduced susceptibility and virologic response to the protease inhibitor tipranavir. *Journal of virology*, 80(21), 10794-10801. doi:10.1128/jvi.00712-06
- Bender, M. A., Kumarasamy, N., Mayer, K. H., Wang, B., Walensky, R. P., Flanigan, T., Schackman, B. R., Scott, C. A., Lu, Z., & Freedberg, K. A. (2010). Cost-effectiveness of tenofovir as first-line antiretroviral therapy in India. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 50(3), 416-425. doi:10.1086/649884
- Benn, S., Rutledge, R., Folks, T., Gold, J., Baker, L., McCormick, J., Feorino, P., Piot, P., Quinn, T., & Martin, M. (1985). Genomic heterogeneity of AIDS retroviral isolates from North America and Zaire. *Science*, 230(4728), 949-951.
- Bibollet-Ruche, F., Peeters, M., Mboup, S., Ekaza, E., Gandji, R., Torimiro, J., Mpoudi, E. N., Amblard, J., Dibanga, G., Saidou, M., Esu-Williams, E., Vanden Haesevelde, M., Saman, E., & Delaporte, E. (1998). Molecular characterization of the envelope transmembrane glycoprotein of 13 new human immunodeficiency virus type 1 group O strains from six different African countries. *AIDS research and human retroviruses*, 14(14), 1281-1285. doi:10.1089/aid.1998.14.1281
- Billong, S. C., Fokam, J., Nkwescheu, A. S., Kembou, E., Milenge, P., Tsomo, Z., Dion, G. N., Aghokeng, A. F., Mpoudi, E. N., Ndumbe, P. M., Colizzi, V., & Elat Nfetam, J. B. (2012). Early warning indicators for HIV drug resistance in Cameroon during the year 2010. *PloS one*, 7(5), e36777. doi:10.1371/journal.pone.0036777
- Billong, S. C., Fokam, J., Penda, C. I., Amadou, S., Kob, D. S., Billong, E. J., Colizzi, V., Ndjolo, A., Bissek, A. Z., & Elat, J. N. (2016). Predictors of poor retention on antiretroviral therapy as a major HIV drug resistance early warning indicator in Cameroon: results from a nationwide systematic random sampling. *BMC infectious diseases*, 16(1), 678. doi:10.1186/s12879-016-1991-3
- Bodelle, P., Vallari, A., Coffey, R., McArthur, C. P., Beyeme, M., Devare, S. G., Schochetman, G., & Brennan, C. A. (2004). Identification and genomic sequence of an HIV type 1 group N isolate from Cameroon. *AIDS research and human retroviruses*, 20(8), 902-908. doi:10.1089/0889222041725262
- Boender, T. S., Sigaloff, K. C., McMahon, J. H., Kiertiburanakul, S., Jordan, M. R., Barcarolo, J., Ford, N., Rinke de Wit, T. F., & Bertagnolio, S. (2015). Long-term Virological Outcomes of First-Line Antiretroviral Therapy for HIV-1 in Low- and Middle-Income Countries: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Infect Dis*, 61(9), 1453-1461. doi:10.1093/cid/civ556

- Brauer, M., De Villiers, J. C., & Mayaphi, S. H. (2013). Evaluation of the Determine fourth generation HIV rapid assay. *J Virol Methods*, *189*(1), 180-183. doi:10.1016/j.jviromet.2013.01.017
- Brennan, C. A., Bodelle, P., Coffey, R., Devare, S. G., Golden, A., Hackett, J., Jr., Harris, B., Holzmayer, V., Luk, K. C., Schochetman, G., Swanson, P., Yamaguchi, J., Vallari, A., Ndembi, N., Ngansop, C., Makamche, F., Mbanya, D., Gurtler, L. G., Zekeng, L., & Kaptue, L. (2008). The prevalence of diverse HIV-1 strains was stable in Cameroonian blood donors from 1996 to 2004. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, *49*(4), 432-439. doi:10.1097/QAI.0b013e3181818a6561
- Briz, V., Garrido, C., Poveda, E., Morello, J., Barreiro, P., de Mendoza, C., & Soriano, V. (2009). Raltegravir and etravirine are active against HIV type 1 group O. *AIDS research and human retroviruses*, *25*(2), 225-227. doi:10.1089/aid.2008.0222
- Brooks, K., Diero, L., DeLong, A., Balamane, M., Reitsma, M., Kemboi, E., Orido, M., Emonyi, W., Coetzer, M., Hogan, J., & Kantor, R. (2016). Treatment failure and drug resistance in HIV-positive patients on tenofovir-based first-line antiretroviral therapy in western Kenya. *Journal of the International AIDS Society*, *19*(1), 20798. doi:10.7448/ias.19.1.20798
- Buonaguro, L., Tornesello, M. L., & Buonaguro, F. M. (2007). Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. *Journal of virology*, *81*(19), 10209-10219. doi:10.1128/jvi.00872-07
- Carr, J. K., Salminen, M. O., Koch, C., Gotte, D., Artenstein, A. W., Hegerich, P. A., St Louis, D., Burke, D. S., & McCutchan, F. E. (1996). Full-length sequence and mosaic structure of a human immunodeficiency virus type 1 isolate from Thailand. *Journal of virology*, *70*(9), 5935-5943.
- Cassan, E., Arigon-Chifolleau, A. M., Mesnard, J. M., Gross, A., & Gascuel, O. (2016). Concomitant emergence of the antisense protein gene of HIV-1 and of the pandemic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(41), 11537-11542. doi:10.1073/pnas.1605739113
- CDC. (1981). Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, *30*(25), 305-308.
- Ceccarelli, L., Salpini, R., Moudourou, S., Cento, V., Santoro, M. M., Fokam, J., Takou, D., Nanfack, A., Dori, L., Torimiro, J., Sarmati, L., Andreoni, M., Perno, C. F., Colizzi, V., & Cappelli, G. (2012). Characterization of drug resistance mutations in naive and ART-treated patients infected with HIV-1 in Yaounde, Cameroon. *Journal of medical virology*, *84*(5), 721-727. doi:10.1002/jmv.23244
- Cereseto, A., Manganaro, L., Gutierrez, M. I., Terreni, M., Fittipaldi, A., Lusic, M., Marcello, A., & Giacca, M. (2005). Acetylation of HIV-1 integrase by p300 regulates viral integration. *The EMBO journal*, *24*(17), 3070-3081. doi:10.1038/sj.emboj.7600770
- Chaix-Baudier, M. L., Chappey, C., Burgard, M., Letourneur, F., Igual, J., Saragosti, S., & Rouzioux, C. (1998). First case of mother-to-infant HIV type 1 group O transmission and evolution of C2V3 sequences in the infected child. French HIV Pediatric Cohort Study Group. *AIDS research and human retroviruses*, *14*(1), 15-23.
- Charneau, P., Borman, A. M., Quillent, C., Guetard, D., Chamaret, S., Cohen, J., Remy, G., Montagnier, L., & Clavel, F. (1994). Isolation and envelope sequence of a highly divergent HIV-1 isolate: definition of a new HIV-1 group. *Virology*, *205*(1), 247-253. doi:10.1006/viro.1994.1640

- Charpentier, C., Talla, F., Nguépi, E., Si-Mohamed, A., & Belec, L. (2011). Virological failure and HIV type 1 drug resistance profiles among patients followed-up in private sector, Douala, Cameroon. *AIDS research and human retroviruses*, 27(2), 221-230. doi:10.1089/aid.2010.0103
- Chen, Z., Luckay, A., Sodora, D. L., Telfer, P., Reed, P., Gettie, A., Kanu, J. M., Sadek, R. F., Yee, J., Ho, D. D., Zhang, L., & Marx, P. A. (1997). 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*, 71(5), 3953-3960.
- Chen, Z., Telfer, P., Gettie, A., Reed, P., Zhang, L., Ho, D. D., & Marx, P. A. (1996). 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*, 70(6), 3617-3627.
- Choe, H., Farzan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P. D., Wu, L., Mackay, C. R., LaRosa, G., Newman, W., Gerard, N., Gerard, C., & Sodroski, J. (1996). The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell*, 85(7), 1135-1148.
- Choi, W. T., & An, J. (2011). Biology and clinical relevance of chemokines and chemokine receptors CXCR4 and CCR5 in human diseases. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 236(6), 637-647. doi:10.1258/ebm.2011.010389
- Christ, F., Shaw, S., Demeulemeester, J., Desimmie, B. A., Marchand, A., Butler, S., Smets, W., Chaltin, P., Westby, M., Debyser, Z., & Pickford, C. (2012). Small-molecule inhibitors of the LEDGF/p75 binding site of integrase block HIV replication and modulate integrase multimerization. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(8), 4365-4374. doi:10.1128/aac.00717-12
- Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M. A., Santos-Ferreira, M. O., Laurent, A. G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., & et al. (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*, 233(4761), 343-346.
- Cournaud, V., Abela, B., Pourrut, X., Mpoudi-Ngole, E., Loul, S., Delaporte, E., & Peeters, M. (2003). Identification of a new simian immunodeficiency virus lineage with a vpu gene present among different cercopithecus monkeys (*C. mona*, *C. cephus*, and *C. nictitans*) from Cameroon. *Journal of virology*, 77(23), 12523-12534.
- Courtney, C. R., Agyingi, L., Fokou, A., Christie, S., Asaah, B., Meli, J., Ngai, J., Hewlett, I., & Nyambi, P. N. (2016). Monitoring HIV-1 Group M Subtypes in Yaounde, Cameroon Reveals Broad Genetic Diversity and a Novel CRF02_AG/F2 Infection. *AIDS research and human retroviruses*, 32(4), 381-385. doi:10.1089/aid.2015.0286
- D'Arc, M., Ayouba, A., Esteban, A., Learn, G. H., Boue, V., Liegeois, F., Etienne, L., Tagg, N., Leendertz, F. H., Boesch, C., Madinda, N. F., Robbins, M. M., Gray, M., Cournil, A., Ooms, M., Letko, M., Simon, V. A., Sharp, P. M., Hahn, B. H., Delaporte, E., Mpoudi Ngole, E., & Peeters, M. (2015). Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi:10.1073/pnas.1502022112
- Dachraoui, R., Depatureaux, A., Chakroun, M., Fodha, I., Letaief, A., Trabelsi, A., Simon, F., & Plantier, J. C. (2008). Monitoring of HIV-1 resistance in Tunisia (North Africa) with a dried plasma spot strategy. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, 47(4), 522-525. doi:10.1097/QAI.0b013e318166498a

- De Clercq, E. (2002). New developments in anti-HIV chemotherapy. *Biochimica et biophysica acta*, 1587(2-3), 258-275.
- de Jong, J. J., Goudsmit, J., Keulen, W., Klaver, B., Krone, W., Tersmette, M., & de Ronde, A. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 clones chimeric for the envelope V3 domain differ in syncytium formation and replication capacity. *Journal of virology*, 66(2), 757-765.
- De Leys, R., Vanderborght, B., Vanden Haesevelde, M., Heyndrickx, L., van Geel, A., Wauters, C., Bernaerts, R., Saman, E., Nijs, P., Willems, B., & et al. (1990). Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin. *Journal of virology*, 64(3), 1207-1216.
- De Oliveira, F., Mourez, T., Vessiere, A., Ngoupo, P. A., Alessandri-Gradt, E., Simon, F., Rousset, D., & Plantier, J. C. (2017). Multiple HIV-1/M + HIV-1/O dual infections and new HIV-1/MO intergroup recombinant forms detected in Cameroon. *Retrovirology*, 14(1), 1. doi:10.1186/s12977-016-0324-3
- Delaugerre, C. (2010). [Genetic barrier to antiretroviral drug-resistance. Focus on raltegravir, the first integrase inhibitor]. *Medecine et maladies infectieuses*, 40 Suppl 1, S1-10. doi:10.1016/s0399-077x(10)70001-9
- Delaugerre, C., De Oliveira, F., Lascoux-Combe, C., Plantier, J.-C., & Simon, F. (2011). HIV-1 group N: travelling beyond Cameroon. *The Lancet*, 378(9806), 1894. doi:10.1016/s0140-6736(11)61457-8
- Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R. E., Hill, C. M., Davis, C. B., Peiper, S. C., Schall, T. J., Littman, D. R., & Landau, N. R. (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*, 381(6584), 661-666. doi:10.1038/381661a0
- Depatureaux, A., Leoz, M., De Oliveira, F., Gueudin, M., Damond, F., Descamps, D., Brun-Vezinet, F., Lemeé, V., Simon, F., Barin, F., & Plantier, J. C. (2010). [Specific diagnosis and follow-up of HIV-1 group O infection: RES-O data]. *Med Mal Infect*, 40(12), 669-676. doi:10.1016/j.medmal.2010.04.011
- Depatureaux, A., Mesplede, T., Quashie, P., Oliveira, M., Moisi, D., Plantier, J. C., Brenner, B., & Wainberg, M. A. (2015). HIV-1 Group O Resistance Against Integrase Inhibitors. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, 70(1), 9-15. doi:10.1097/qai.0000000000000698
- Descamps, D., Collin, G., Letourneur, F., Apetrei, C., Damond, F., Loussert-Ajaka, I., Simon, F., Saragosti, S., & Brun-Vezinet, F. (1997). Susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 group O isolates to antiretroviral agents: in vitro phenotypic and genotypic analyses. *Journal of virology*, 71(11), 8893-8898.
- Domingo, E., & Holland, J. J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual review of microbiology*, 51, 151-178. doi:10.1146/annurev.micro.51.1.151
- E Simon-Lorière, R. G., M Negroni. (2006). Caractéristiques mécanistiques de la recombinaison chez le virus de l'immunodéficience humaine. *Virologie*, 10(6), 431-442. doi:10.1684/vir.2006.0040

- Eijkelenboom, A. P., Lutzke, R. A., Boelens, R., Plasterk, R. H., Kaptein, R., & Hard, K. (1995). The DNA-binding domain of HIV-1 integrase has an SH3-like fold. *Nature structural biology*, 2(9), 807-810.
- Ellison, V., & Brown, P. O. (1994). A stable complex between integrase and viral DNA ends mediates human immunodeficiency virus integration in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(15), 7316-7320.
- Espeseth, A. S., Felock, P., Wolfe, A., Witmer, M., Grobler, J., Anthony, N., Egbertson, M., Melamed, J. Y., Young, S., Hamill, T., Cole, J. L., & Hazuda, D. J. (2000). HIV-1 integrase inhibitors that compete with the target DNA substrate define a unique strand transfer conformation for integrase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(21), 11244-11249. doi:10.1073/pnas.200139397
- Estill, J., Ford, N., Salazar-Vizcaya, L., Haas, A. D., Blaser, N., Habiyambere, V., & Keiser, O. (2016). The need for second-line antiretroviral therapy in adults in sub-Saharan Africa up to 2030: a mathematical modelling study. *The lancet. HIV*, 3(3), e132-139. doi:10.1016/s2352-3018(16)00016-3
- Fahey, J. L., Taylor, J. M., Detels, R., Hofmann, B., Melmed, R., Nishanian, P., & Giorgi, J. V. (1990). The prognostic value of cellular and serologic markers in infection with human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med*, 322(3), 166-172. doi:10.1056/nejm199001183220305
- Faria, N. R., Suchard, M. A., Abecasis, A., Sousa, J. D., Ndembi, N., Bonfim, I., Camacho, R. J., Vandamme, A. M., & Lemey, P. (2012). Phylodynamics of the HIV-1 CRF02_AG clade in Cameroon. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 12(2), 453-460. doi:10.1016/j.meegid.2011.04.028
- Fei, D. T., Paxton, H., & Chen, A. B. (1993). Difficulties in precise quantitation of CD4+ T lymphocytes for clinical trials: a review. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*, 21(3), 221-231. doi:10.1006/biol.1993.1079
- Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., & Berger, E. A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, 272(5263), 872-877.
- Fokam, J., Billong, S. C., Bissek, A. C., Kembou, E., Milenge, P., Abessouguie, I., Nkwescheu, A. S., Tsomo, Z., Aghokeng, A. F., Ngute, G. D., Ndumbe, P. M., Colizzi, V., & Elat, J. B. (2013). Declining trends in early warning indicators for HIV drug resistance in Cameroon from 2008-2010: lessons and challenges for low-resource settings. *BMC public health*, 13, 308. doi:10.1186/1471-2458-13-308
- Fonsah, J. Y., Njamnshi, A. K., Kouanfack, C., Qiu, F., Njamnshi, D. M., Tagny, C. T., Nchindap, E., Kenmogne, L., Mbanya, D., Heaton, R., & Kanmogne, G. D. (2017). Adherence to Antiretroviral Therapy (ART) in Yaounde-Cameroon: Association with Opportunistic Infections, Depression, ART Regimen and Side Effects. *PloS one*, 12(1), e0170893. doi:10.1371/journal.pone.0170893
- Fricke, T., White, T. E., Schulte, B., de Souza Aranha Vieira, D. A., Dharan, A., Campbell, E. M., Brandariz-Nunez, A., & Diaz-Griffero, F. (2014). MxB binds to the HIV-1 core and prevents the uncoating process of HIV-1. *Retrovirology*, 11, 68. doi:10.1186/s12977-014-0068-x
- Froland, S. S., Jenum, P., Lindboe, C. F., Wefring, K. W., Linnestad, P. J., & Bohmer, T. (1988). HIV-1 infection in Norwegian family before 1970. *Lancet*, 1(8598), 1344-1345.

- Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Haynes, B. F., Palker, T. J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., & et al. (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*, 224(4648), 500-503.
- Gallo, R. C., Sarin, P. S., Gelmann, E. P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V. S., Mann, D., Sidhu, G. D., Stahl, R. E., Zolla-Pazner, S., Leibowitch, J., & Popovic, M. (1983). Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220(4599), 865-867.
- Gao, F., Bailes, E., Robertson, D. L., Chen, Y., Rodenburg, C. M., Michael, S. F., Cummins, L. B., Arthur, L. O., Peeters, M., Shaw, G. M., Sharp, P. M., & Hahn, B. H. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*, 397(6718), 436-441. doi:10.1038/17130
- Garcia-Lerma, G., Gutierrez, M., Mas, A., Bravo, R., Aguilera, O., & Soriano, V. (1996). [Report of the first 2 cases of HIV-1 group O infection in Spain]. *Medicina clinica*, 107(11), 418-421.
- Garcia, P. M., Kalish, L. A., Pitt, J., Minkoff, H., Quinn, T. C., Burchett, S. K., Kornegay, J., Jackson, B., Moye, J., Hanson, C., Zorrilla, C., & Lew, J. F. (1999). Maternal levels of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA and the risk of perinatal transmission. Women and Infants Transmission Study Group. *N Engl J Med*, 341(6), 394-402. doi:10.1056/nejm199908053410602
- Gautheret-Dejean, A., Mesmin-Poho, S., Birguel, J., Lemee, V., Huraux, J. M., & Plantier, J. C. (2008). Unequal detection of HIV type 1 group O infection by simple rapid tests. *Clin Infect Dis*, 46(12), 1936-1937. doi:10.1086/588561
- Gottlieb, M. S., Schroff, R., Schanker, H. M., Weisman, J. D., Fan, P. T., Wolf, R. A., & Saxon, A. (1981). Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med*, 305(24), 1425-1431. doi:10.1056/nejm198112103052401
- Gould, K. (1997). Infection with HIV-1 group O. *AIDS patient care and STDs*, 11(6), 399-405. doi:10.1089/apc.1997.11.399
- Greg+. (2015). Greg+ algorithm Accessed 25 November 2015. Available from: <https://virologie.chu-grenoble.fr/greg+/pubwiki/pmwiki.php>.
- Group., T. S. (2016). Global epidemiology of drug resistance after failure of WHO recommended first-line regimens for adult HIV-1 infection: a multicentre retrospective cohort study. *The Lancet. Infectious diseases*, 16(5), 565-575. doi:10.1016/s1473-3099(15)00536-8
- Gueudin, M., Baron, A., Alessandri-Gradt, E., Lemee, V., Mourez, T., Etienne, M., & Plantier, J. C. (2016). Performance Evaluation of the New HIV-1 Quantification Assay, Xpert HIV-1 Viral Load, on a Wide Panel of HIV-1 Variants. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, 72(5), 521-526. doi:10.1097/qai.0000000000001003
- Gueudin, M., Lemee, V., Ferre, V., Beby-Defaux, A., Pathe, J. P., Guist'hau, O., Braun, J., Simon, F., & Plantier, J. C. (2004). Virologic diagnosis and follow-up of children born to mothers infected by HIV-1 group O. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, 36(1), 639-641.

- Gueudin, M., Leoz, M., Lemee, V., De Oliveira, F., Vessiere, A., Kfutwah, A., & Plantier, J. C. (2012). A new real-time quantitative PCR for diagnosis and monitoring of HIV-1 group O infection. *Journal of clinical microbiology*, *50*(3), 831-836. doi:10.1128/jcm.05669-11
- Gueudin, M., Plantier, J. C., Damond, F., Roques, P., Mauciere, P., & Simon, F. (2003). Plasma viral RNA assay in HIV-1 group O infection by real-time PCR. *J Virol Methods*, *113*(1), 43-49.
- Gueudin, M., Plantier, J. C., Lemee, V., Schmitt, M. P., Chartier, L., Bourlet, T., Ruffault, A., Damond, F., Vray, M., & Simon, F. (2007). Evaluation of the Roche Cobas TaqMan and Abbott RealTime extraction-quantification systems for HIV-1 subtypes. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*, *44*(5), 500-505. doi:10.1097/QAI.0b013e31803260df
- Gupta, R. K., Chrystie, I. L., O'Shea, S., Mullen, J. E., Kulasegaram, R., & Tong, C. Y. (2005). K65R and Y181C are less prevalent in HAART-experienced HIV-1 subtype A patients. *AIDS (London, England)*, *19*(16), 1916-1919.
- Gupta, R. K., Hill, A., Sawyer, A. W., Cozzi-Lepri, A., von Wyl, V., Yerly, S., Lima, V. D., Gunthard, H. F., Gilks, C., & Pillay, D. (2009). Virological monitoring and resistance to first-line highly active antiretroviral therapy in adults infected with HIV-1 treated under WHO guidelines: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Infectious diseases*, *9*(7), 409-417. doi:10.1016/s1473-3099(09)70136-7
- Gurtler, L. (2004). [SIV as a source of HIV. On the origin of human immunodeficiency viruses from non-human primates]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*, *47*(7), 680-684. doi:10.1007/s00103-004-0862-z
- Gurtler, L. G., Hauser, P. H., Eberle, J., von Brunn, A., Knapp, S., Zekeng, L., Tsague, J. M., & Kaptue, L. (1994). A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *Journal of virology*, *68*(3), 1581-1585.
- Guyader, M., Emerman, M., Sonigo, P., Clavel, F., Montagnier, L., & Alizon, M. (1987). Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature*, *326*(6114), 662-669. doi:10.1038/326662a0
- Hahn, B. H., Shaw, G. M., De Cock, K. M., & Sharp, P. M. (2000). AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science*, *287*(5453), 607-614.
- Hamers, R. L., Sigaloff, K. C., Wensing, A. M., Wallis, C. L., Kityo, C., Siwale, M., Mandaliya, K., Ive, P., Botes, M. E., Wellington, M., Osibogun, A., Stevens, W. S., Rinke de Wit, T. F., & Schuurman, R. (2012). Patterns of HIV-1 drug resistance after first-line antiretroviral therapy (ART) failure in 6 sub-Saharan African countries: implications for second-line ART strategies. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *54*(11), 1660-1669. doi:10.1093/cid/cis254
- Hampfl, H., Sawitzky, D., Stoffler-Meilicke, M., Groh, A., Schmitt, M., Eberle, J., & Gurtler, L. (1995). First case of HIV-1 subtype O infection in Germany. *Infection*, *23*(6), 369-370.
- Harrigan, P. R., Bloor, S., & Larder, B. A. (1998). Relative replicative fitness of zidovudine-resistant human immunodeficiency virus type 1 isolates in vitro. *Journal of virology*, *72*(5), 3773-3778.
- Hassan, A. S., Nabwera, H. M., Mwaringa, S. M., Obonyo, C. A., Sanders, E. J., Rinke de Wit, T. F., Cane, P. A., & Berkley, J. A. (2014). HIV-1 virologic failure and acquired drug resistance among first-

- line antiretroviral experienced adults at a rural HIV clinic in coastal Kenya: a cross-sectional study. *AIDS research and therapy*, 11(1), 9. doi:10.1186/1742-6405-11-9
- Hawkins, C. A., Chaplin, B., Idoko, J., Ekong, E., Adewole, I., Gashau, W., Murphy, R. L., & Kanki, P. (2009). Clinical and genotypic findings in HIV-infected patients with the K65R mutation failing first-line antiretroviral therapy in Nigeria. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, 52(2), 228-234. doi:10.1097/QAI.0b013e3181b06125
- Hemelaar, J. (2012). The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends in molecular medicine*, 18(3), 182-192. doi:10.1016/j.molmed.2011.12.001
- Hemelaar, J. (2013). Implications of HIV diversity for the HIV-1 pandemic. *The Journal of infection*, 66(5), 391-400. doi:10.1016/j.jinf.2012.10.026
- Hemelaar, J., Gouws, E., Ghys, P. D., & Osmanov, S. (2011). Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *Aids*, 25(5), 679-689. doi:10.1097/QAD.0b013e328342ff93
- Heyndrickx, L., Janssens, W., Gurtler, L., Zekeng, L., Loussert-Ajaka, I., Vereecken, K., Willems, B., Coppens, S., Ndumbe, P., Franssen, K., Saman, E., Alary, M., & van der Groen, G. (1998). Differential diagnosis of HIV type 1 group O and M infection by polymerase chain reaction and PstI restriction analysis of the pol gene fragment. *AIDS research and human retroviruses*, 14(11), 973-977.
- Hioe, C. E., Wrin, T., Seaman, M. S., Yu, X., Wood, B., Self, S., Williams, C., Gorny, M. K., & Zolla-Pazner, S. (2010). Anti-V3 monoclonal antibodies display broad neutralizing activities against multiple HIV-1 subtypes. *PLoS One*, 5(4), e10254. doi:10.1371/journal.pone.0010254
- Hirschall, G., Harries, A. D., Easterbrook, P. J., Doherty, M. C., & Ball, A. (2013). The next generation of the World Health Organization's global antiretroviral guidance. *Journal of the International AIDS Society*, 16, 18757. doi:10.7448/ias.16.1.18757
- Holm-Hansen, C., Baan, E., Asjo, B., Pascu, F. R., Goudsmit, J., & De Jong, J. J. (2000). Determinants for the syncytium-inducing phenotype of HIV-1 subtype F isolates are located in the V3 region. *AIDS research and human retroviruses*, 16(9), 867-870. doi:10.1089/08892220050042800
- Hombrouck, A., De Rijck, J., Hendrix, J., Vandekerckhove, L., Voet, A., De Maeyer, M., Witvrouw, M., Engelborghs, Y., Christ, F., Gijsbers, R., & Debyser, Z. (2007). Virus evolution reveals an exclusive role for LEDGF/p75 in chromosomal tethering of HIV. *PLoS Pathog*, 3(3), e47. doi:10.1371/journal.ppat.0030047
- Howard, T. M., & Rasheed, S. (1996). Genomic structure and nucleotide sequence analysis of a new HIV type 1 subtype A strain from Nigeria. *AIDS research and human retroviruses*, 12(15), 1413-1425.
- Hu, W.-S., & Hughes, S. H. (2012). HIV-1 Reverse Transcription. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(10). doi:10.1101/cshperspect.a006882
- Huang, H., Chopra, R., Verdine, G. L., & Harrison, S. C. (1998). Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science*, 282(5394), 1669-1675.
- INS-Cameroun. (2012). Enquête Démographique et de Santé et à Indicateurs Multiples du Cameroun 2011.

- Jaffe, H. W., & Schochetman, G. (1998). Group O human immunodeficiency virus-1 infections. *Infectious disease clinics of North America*, 12(1), 39-46.
- Janssens, W., Heyndrickx, L., Van der Auwera, G., Nkengasong, J., Beirnaert, E., Vereecken, K., Coppens, S., Willems, B., Fransen, K., Peeters, M., Ndumbe, P., Delaporte, E., & van der Groen, G. (1999). Interpatient genetic variability of HIV-1 group O. *Aids*, 13(1), 41-48.
- Jewell, N. A., Chen, R., Raices, R., & Mansky, L. M. (2003). Nucleoside reverse transcriptase inhibitors and HIV mutagenesis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 52(4), 547-550. doi:10.1093/jac/dkg387
- Jiamsakul, A., Sungkanuparph, S., Law, M., Kantor, R., Preparattapan, J., Li, P. C., Phanuphak, P., Merati, T., Ratanasuwan, W., Lee, C. K., Ditangco, R., Mustafa, M., Singtoroj, T., & Kiertiburanakul, S. (2014). HIV multi-drug resistance at first-line antiretroviral failure and subsequent virological response in Asia. *Journal of the International AIDS Society*, 17, 19053. doi:10.7448/ias.17.1.19053
- Jonassen, T. O., Stene-Johansen, K., Berg, E. S., Hungnes, O., Lindboe, C. F., Froland, S. S., & Grinde, B. (1997). Sequence analysis of HIV-1 group O from Norwegian patients infected in the 1960s. *Virology*, 231(1), 43-47.
- Jones, J., Taylor, B. S., Tieu, H. V., & Wilkin, T. J. (2017). CROI 2017: Advances in Antiretroviral Therapy. *Topics in antiviral medicine*, 25(2), 51-67.
- Kanki, P. J., Barin, F., M'Boup, S., Allan, J. S., Romet-Lemonne, J. L., Marlink, R., McLane, M. F., Lee, T. H., Arbeille, B., Denis, F., & et al. (1986). New human T-lymphotropic retrovirus related to simian T-lymphotropic virus type III (STLV-IIIAGM). *Science*, 232(4747), 238-243.
- Kanki, P. J., Travers, K. U., S, M. B., Hsieh, C. C., Marlink, R. G., Gueye, N. A., Siby, T., Thior, I., Hernandez-Avila, M., Sankale, J. L., & et al. (1994). Slower heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1. *Lancet*, 343(8903), 943-946.
- Kantor, R., Shafer, R. W., Follansbee, S., Taylor, J., Shilane, D., Hurley, L., Nguyen, D. P., Katzenstein, D., & Fessel, W. J. (2004). Evolution of resistance to drugs in HIV-1-infected patients failing antiretroviral therapy. *AIDS (London, England)*, 18(11), 1503-1511.
- Keele, B. F., Van Heuverswyn, F., Li, Y., Bailes, E., Takehisa, J., Santiago, M. L., Bibollet-Ruche, F., Chen, Y., Wain, L. V., Liegeois, F., Loul, S., Ngole, E. M., Bienvenue, Y., Delaporte, E., Brookfield, J. F., Sharp, P. M., Shaw, G. M., Peeters, M., & Hahn, B. H. (2006). Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science*, 313(5786), 523-526. doi:10.1126/science.1126531
- Kelly, B. N., Kyere, S., Kinde, I., Tang, C., Howard, B. R., Robinson, H., Sundquist, W. I., Summers, M. F., & Hill, C. P. (2007). Structure of the antiviral assembly inhibitor CAP-1 complex with the HIV-1 CA protein. *Journal of molecular biology*, 373(2), 355-366. doi:10.1016/j.jmb.2007.07.070
- Kfutwah, A., Lemee, V., Ngono, H. V., De Oliveira, F., Njouom, R., & Plantier, J. C. (2013a). Field evaluation of the Abbott ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo immunoassay. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 58 Suppl 1, e70-75. doi:10.1016/j.jcv.2013.08.015

- Kfutwah, A., Lemee, V., Ngono, H. V., De Oliveira, F., Njouom, R., & Plantier, J. C. (2013b). Field evaluation of the Abbott ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo immunoassay. *J Clin Virol*. 2013 Dec;58 Suppl 1:e70-5. doi: 10.1016/j.jcv.2013.08.015. Epub 2013 Aug 27.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 16(2), 111-120.
- King, N. M., Prabu-Jeyabalan, M., Bandaranayake, R. M., Nalam, M. N., Nalivaika, E. A., Ozen, A., Haliloglu, T., Yilmaz, N. K., & Schiffer, C. A. (2012). Extreme entropy-enthalpy compensation in a drug-resistant variant of HIV-1 protease. *ACS chemical biology*, 7(9), 1536-1546. doi:10.1021/cb300191k
- Laborde-Balen, G., Taverne, B., Ndour, C. T., Kouanfack, C., Peeters, M., Ndoye, I., & Delaporte, E. (2018). The fourth HIV epidemic. *The Lancet. Infectious diseases*, 18(4), 379-380. doi:10.1016/s1473-3099(18)30167-1
- Lalezari, J. P., Latiff, G. H., Brinson, C., Echevarria, J., Trevino-Perez, S., Bogner, J. R., Thompson, M., Fourie, J., Sussmann Pena, O. A., Mendo Urbina, F. C., Martins, M., Diaconescu, I. G., Stock, D. A., Joshi, S. R., Hanna, G. J., & Lataillade, M. (2015). Safety and efficacy of the HIV-1 attachment inhibitor prodrug BMS-663068 in treatment-experienced individuals: 24 week results of A1438011, a phase 2b, randomised controlled trial. *The lancet. HIV*, 2(10), e427-437. doi:10.1016/s2352-3018(15)00177-0
- Lamorte, L., Titolo, S., Lemke, C. T., Goudreau, N., Mercier, J. F., Wardrop, E., Shah, V. B., von Schwedler, U. K., Langelier, C., Banik, S. S., Aiken, C., Sundquist, W. I., & Mason, S. W. (2013). Discovery of novel small-molecule HIV-1 replication inhibitors that stabilize capsid complexes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(10), 4622-4631. doi:10.1128/aac.00985-13
- Laperche, S., Leballais, L., Ly, T. D., & Plantier, J. C. (2012). Failures in the detection of HIV p24 antigen with the Determine HIV-1/2 Ag/Ab Combo rapid test. *The Journal of infectious diseases*, 206(12), 1946-1947; author reply 1949-1950. doi:10.1093/infdis/jis616
- Lau, K. A., & Wong, J. J. (2013). Current Trends of HIV Recombination Worldwide. *Infectious disease reports*, 5(Suppl 1), e4. doi:10.4081/idr.2013.s1.e4
- Lemee, V., Leoz, M., Etienne, M., De Oliveira, F., & Plantier, J. C. (2014). Performance of the Liaison XL Murex HIV Ab/Ag test on clinical samples representing current epidemic HIV variants. *Journal of clinical microbiology*, 52(9), 3277-3279. doi:10.1128/jcm.01089-14
- Lemke, C. T., Titolo, S., von Schwedler, U., Goudreau, N., Mercier, J. F., Wardrop, E., Faucher, A. M., Coulombe, R., Banik, S. S., Fader, L., Gagnon, A., Kawai, S. H., Rancourt, J., Tremblay, M., Yoakim, C., Simoneau, B., Archambault, J., Sundquist, W. I., & Mason, S. W. (2012). Distinct effects of two HIV-1 capsid assembly inhibitor families that bind the same site within the N-terminal domain of the viral CA protein. *Journal of virology*, 86(12), 6643-6655. doi:10.1128/jvi.00493-12
- Leoz, M., Depatureaux, A., Vessiere, A., Roquebert, B., Damond, F., Rousset, D., Roques, P., Simon, F., Plantier, J. C., & group, R.-O. (2008). Integrase polymorphism and HIV-1 group O diversity. *Aids*, 22(10), 1239-1243. doi:10.1097/QAD.0b013e3283021c30
- Leoz, M., Feyertag, F., Kfutwah, A., Mauclere, P., Lachenal, G., Damond, F., De Oliveira, F., Lemee, V., Simon, F., Robertson, D. L., & Plantier, J. C. (2015). The Two-Phase Emergence of Non Pandemic

- HIV-1 Group O in Cameroon. *PLoS Pathog*, 11(8), e1005029. doi:10.1371/journal.ppat.1005029
- Levy, J. A. (1993). Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiological reviews*, 57(1), 183-289.
- Levy, J. A., Hoffman, A. D., Kramer, S. M., Landis, J. A., Shimabukuro, J. M., & Oshiro, L. S. (1984). Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science*, 225(4664), 840-842.
- Liegeois, F., Vella, C., Eymard-Duvernay, S., Sica, J., Makosso, L., Mouinga-Ondeme, A., Mongo, A. D., Boue, V., Butel, C., Peeters, M., Gonzalez, J. P., Delaporte, E., & Rouet, F. (2012). Virological failure rates and HIV-1 drug resistance patterns in patients on first-line antiretroviral treatment in semirural and rural Gabon. *Journal of the International AIDS Society*, 15(2), 17985. doi:10.7448/ias.15.2.17985
- Lihana, R. W., Ssemwanga, D., Abimiku, A., & Ndembu, N. (2012). Update on HIV-1 diversity in Africa: a decade in review. *AIDS reviews*, 14(2), 83-100.
- Liu, T. F., & Shafer, R. W. (2006). Web resources for HIV type 1 genotypic-resistance test interpretation. *Clin Infect Dis*, 42(11), 1608-1618. doi:10.1086/503914
- Lodi, P. J., Ernst, J. A., Kuszewski, J., Hickman, A. B., Engelman, A., Craigie, R., Clore, G. M., & Gronenborn, A. M. (1995). Solution structure of the DNA binding domain of HIV-1 integrase. *Biochemistry*, 34(31), 9826-9833.
- Loussert-Ajaka, I., Chaix, M. L., Korber, B., Letourneur, F., Gomas, E., Allen, E., Ly, T. D., Brun-Vezinet, F., Simon, F., & Saragosti, S. (1995). Variability of human immunodeficiency virus type 1 group O strains isolated from Cameroonian patients living in France. *Journal of virology*, 69(9), 5640-5649.
- Loussert-Ajaka, I., Ly, T. D., Chaix, M. L., Ingrand, D., Saragosti, S., Courouce, A. M., Brun-Vezinet, F., & Simon, F. (1994). HIV-1/HIV-2 seronegativity in HIV-1 subtype O infected patients. *Lancet*, 343(8910), 1393-1394.
- Louwagie, J., McCutchan, F. E., Peeters, M., Brennan, T. P., Sanders-Buell, E., Eddy, G. A., van der Groen, G., Fransen, K., Gershy-Damet, G. M., Deleys, R., & et al. (1993). Phylogenetic analysis of gag genes from 70 international HIV-1 isolates provides evidence for multiple genotypes. *Aids*, 7(6), 769-780.
- Ly, T. D., Plantier, J. C., Leballais, L., Gonzalo, S., Lemee, V., & Laperche, S. (2012). The variable sensitivity of HIV Ag/Ab combination assays in the detection of p24Ag according to genotype could compromise the diagnosis of early HIV infection. *J Clin Virol*, 55(2), 121-127. doi:10.1016/j.jcv.2012.06.012
- M, A. (1997). *Récepteurs de chimiokines et entrée du VIH* Vol. 1. J. L. Eurotext (Ed.) (pp. 471-479).
- Maartens, G., Celum, C., & Lewin, S. R. (2014). HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *Lancet*, 384(9939), 258-271. doi:10.1016/s0140-6736(14)60164-1
- Malcolm, Z., & Rimland, D. (1983). Acquired immune deficiency syndrome. *Physician assistant (American Academy of Physician Assistants)*, 7(10), 31-32, 37-41, 44-36.

- Mann, J. M. (1987). Statement at an informal briefing on AIDS to the 42nd session of the United Nations General Assembly on Tuesday 20th October 1987. <http://apps.who.int/iris/handle/10665/61546>.
- Mansky, L. M., & Temin, H. M. (1995). Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *Journal of virology*, 69(8), 5087-5094.
- Marcelin, A. G., Masquelier, B., Descamps, D., Izopet, J., Charpentier, C., Alloui, C., Bouvier-Alias, M., Signori-Schmuck, A., Montes, B., Chaix, M. L., Amiel, C., Santos, G. D., Ruffault, A., Barin, F., Peytavin, G., Lavignon, M., Flandre, P., & Calvez, V. (2008). Tipranavir-ritonavir genotypic resistance score in protease inhibitor-experienced patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(9), 3237-3243. doi:10.1128/aac.00133-08
- Marconi, V. C., Sunpath, H., Lu, Z., Gordon, M., Koranteng-Apeagyei, K., Hampton, J., Carpenter, S., Giddy, J., Ross, D., Holst, H., Losina, E., Walker, B. D., & Kuritzkes, D. R. (2008). Prevalence of HIV-1 drug resistance after failure of a first highly active antiretroviral therapy regimen in KwaZulu Natal, South Africa. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 46(10), 1589-1597. doi:10.1086/587109
- Margolis, D. A., Brinson, C. C., Smith, G. H. R., de Vente, J., Hagins, D. P., Eron, J. J., Griffith, S. K., Clair, M. H. S., Stevens, M. C., Williams, P. E., Ford, S. L., Stancil, B. S., Bomar, M. M., Hudson, K. J., Smith, K. Y., & Spreen, W. R. (2015). Cabotegravir plus rilpivirine, once a day, after induction with cabotegravir plus nucleoside reverse transcriptase inhibitors in antiretroviral-naive adults with HIV-1 infection (LATTE): a randomised, phase 2b, dose-ranging trial. *The Lancet. Infectious diseases*, 15(10), 1145-1155. doi:10.1016/s1473-3099(15)00152-8
- Margot, N. A., Gibbs, C. S., & Miller, M. D. (2010). Phenotypic susceptibility to bevirimat in isolates from HIV-1-infected patients without prior exposure to bevirimat. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(6), 2345-2353. doi:10.1128/aac.01784-09
- Marlink, R., Kanki, P., Thior, I., Travers, K., Eisen, G., Siby, T., Traore, I., Hsieh, C. C., Dia, M. C., Gueye, E. H., & et al. (1994). Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science*, 265(5178), 1587-1590.
- Martinez-Picado, J., Savara, A. V., Sutton, L., & D'Aquila, R. T. (1999). Replicative fitness of protease inhibitor-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology*, 73(5), 3744-3752.
- Mas, A., Quinones-Mateu, E., Soriano, V., & Domingo, E. (1996). Env gene characterization of the first HIV type 1 group O Spanish isolate. *AIDS research and human retroviruses*, 12(17), 1647-1649. doi:10.1089/aid.1996.12.1647
- Masciotra, S., Garrido, C., Youngpairoj, A. S., McNulty, A., Zahonero, N., Corral, A., Heneine, W., de Mendoza, C., & Garcia-Lerma, J. G. (2007). High concordance between HIV-1 drug resistance genotypes generated from plasma and dried blood spots in antiretroviral-experienced patients. *AIDS (London, England)*, 21(18), 2503-2511. doi:10.1097/QAD.0b013e3281c618db
- Mauclere, P., Damond, F., Apetrei, C., Loussert-Ajaka, I., Souquiere, S., Buzelay, L., Dalbon, P., Jolivet, M., Mony Lobe, M., Brun-Vezinet, F., Simon, F., & Barin, F. (1997). Synthetic peptide ELISAs for detection of and discrimination between group M and group O HIV type 1 infection. *AIDS research and human retroviruses*, 13(12), 987-993.

- McColl, D. J., & Chen, X. (2010). Strand transfer inhibitors of HIV-1 integrase: bringing IN a new era of antiretroviral therapy. *Antiviral research*, *85*(1), 101-118. doi:10.1016/j.antiviral.2009.11.004
- McNulty, A., Jennings, C., Bennett, D., Fitzgibbon, J., Bremer, J. W., Ussery, M., Kalish, M. L., Heneine, W., & Garcia-Lerma, J. G. (2007). Evaluation of dried blood spots for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance testing. *Journal of clinical microbiology*, *45*(2), 517-521. doi:10.1128/jcm.02016-06
- Mellors, J. W., Munoz, A., Giorgi, J. V., Margolick, J. B., Tassoni, C. J., Gupta, P., Kingsley, L. A., Todd, J. A., Saah, A. J., Detels, R., Phair, J. P., & Rinaldo, C. R., Jr. (1997). Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Annals of internal medicine*, *126*(12), 946-954.
- Meresse, M., Carrieri, M. P., Laurent, C., Kouanfack, C., Protopopescu, C., Blanche, J., Cohen, J., Laborde-Balen, G., Aghokeng, A. F., Spire, B., Moatti, J. P., Delaporte, E., & Boyer, S. (2013). Time patterns of adherence and long-term virological response to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor regimens in the Stratall ANRS 12110/ESTHER trial in Cameroon. *Antiviral therapy*, *18*(1), 29-37. doi:10.3851/imp2535
- Meyerhans, A., Cheynier, R., Albert, J., Seth, M., Kwok, S., Sninsky, J., Morfeldt-Manson, L., Asjo, B., & Wain-Hobson, S. (1989). Temporal fluctuations in HIV quasispecies in vivo are not reflected by sequential HIV isolations. *Cell*, *58*(5), 901-910.
- MINSANTE. (2014). Directives nationales de prevention et de prise en charge du VIH au Cameroun.
- Mourez, T., Simon, F., & Plantier, J. C. (2013). Non-M variants of human immunodeficiency virus type 1. *Clinical microbiology reviews*, *26*(3), 448-461. doi:10.1128/cmr.00012-13
- Myers, G., MaInnes, K., & Korber, B. (1992). The emergence of simian/human immunodeficiency viruses. *AIDS research and human retroviruses*, *8*(3), 373-386. doi:10.1089/aid.1992.8.373
- Ndembi, N., Iwamoto, S., Ngansop, C., Lemey, P., Abimiku, A., Mbanya, D., Kaptue, L. N., & Ido, E. (2011). High frequency of HIV-1 dual infections in Cameroon, West Central Africa. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, *57*(2), e25-27. doi:10.1097/QAI.0b013e3182142082
- Nettles, R. E., Schurmann, D., Zhu, L., Stonier, M., Huang, S. P., Chang, I., Chien, C., Krystal, M., Wind-Rotolo, M., Ray, N., Hanna, G. J., Bertz, R., & Grasela, D. (2012). Pharmacodynamics, safety, and pharmacokinetics of BMS-663068, an oral HIV-1 attachment inhibitor in HIV-1-infected subjects. *The Journal of infectious diseases*, *206*(7), 1002-1011. doi:10.1093/infdis/jis432
- Ngoupo, P. A., Sadeuh-Mba, S. A., De Oliveira, F., Ngono, V., Ngono, L., Tchendjou, P., Penlap, V., Mourez, T., Njouom, R., Kfutwah, A., & Plantier, J. C. (2016). First evidence of transmission of an HIV-1 M/O intergroup recombinant virus. *Aids*, *30*(1), 1-8. doi:10.1097/qad.0000000000000880
- Nkengasong, J. N., Fransen, K., Willems, B., Karita, E., Vingerhoets, J., Kestens, L., Colebunders, R., Piot, P., & van der Groen, G. (1997). Virologic, immunologic, and clinical follow-up of a couple infected by the human immunodeficiency virus type one, group O. *Journal of medical virology*, *51*(3), 202-209.

- Nkengasong, J. N., Peeters, M., vanden Haesevelde, M., Musi, S. S., Willems, B., Ndumbe, P. M., Delaporte, E., Perret, J. L., Piot, P., & van den Groen, G. (1993). Antigenic evidence of the presence of the aberrant HIV-1ant70 virus in Cameroon and Gabon. *AIDS*, 7(11), 1536-1538.
- Nowak, M. A. (1992). What is a quasispecies? *Trends in ecology & evolution*, 7(4), 118-121. doi:10.1016/0169-5347(92)90145-2
- Nowicka-Sans, B., Protack, T., Lin, Z., Li, Z., Zhang, S., Sun, Y., Samanta, H., Terry, B., Liu, Z., Chen, Y., Sin, N., Sit, S. Y., Swidorski, J. J., Chen, J., Venables, B. L., Healy, M., Meanwell, N. A., Cockett, M., Hanumegowda, U., Regueiro-Ren, A., Krystal, M., & Dicker, I. B. (2016). Identification and Characterization of BMS-955176, a Second-Generation HIV-1 Maturation Inhibitor with Improved Potency, Antiviral Spectrum, and Gag Polymorphic Coverage. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(7), 3956-3969. doi:10.1128/aac.02560-15
- Nyambi, P., Heyndrickx, L., Vereecken, K., Burda, S., De Houwer, K., Coppens, S., Urbanski, M., Williams, C., Ndumbe, P., & Janssens, W. (2002). Predominance of infection with HIV-1 circulating recombinant form CRF02_AG in major Cameroonian cities and towns. *Aids*, 16(2), 295-296.
- Olaleye, D. O., Sheng, Z., Howard, T. M., & Rasheed, S. (1996). Isolation and characterization of a new subtype A variant of human immunodeficiency virus type I from Nigeria. *Trop Med Int Health*, 1(1), 97-106.
- ONUSIDA. (2014a). Objectif 90/90/90. Accessed 15 March 2014. Available from: , http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/90-90-90_fr.pdf.
- ONUSIDA. (2014b). Rapport droitsdes enfants. Accessed 22 August 2015. Available from: http://www.ville-geneve.ch/fileadmin/public/Departement_5/Publications/2014/Rapport-droits-enfants-ville-Geneve.pdf.
- ONUSIDA. (2017). <http://www.unaids.org/fr/resources/fact-sheet>.
- ORC-Macro, I. N. d. I. S. a. (2011). Enquête Démographique et de Santé du Cameroun 2011.
- Organization, W. H. (2010). WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee *Antiretroviral Therapy for HIV Infection in Adults and Adolescents: Recommendations for a Public Health Approach: 2010 Revision*. Geneva: World Health Organization
- World Health Organization.
- Paillart, J. C., Shehu-Xhilaga, M., Marquet, R., & Mak, J. (2004). Dimerization of retroviral RNA genomes: an inseparable pair. *Nature reviews. Microbiology*, 2(6), 461-472. doi:10.1038/nrmicro903
- Parikh, U. M., Barnas, D. C., Faruki, H., & Mellors, J. W. (2006). Antagonism between the HIV-1 reverse-transcriptase mutation K65R and thymidine-analogue mutations at the genomic level. *The Journal of infectious diseases*, 194(5), 651-660. doi:10.1086/505711
- Parkin, N. T., Hellmann, N. S., Whitcomb, J. M., Kiss, L., Chappey, C., & Petropoulos, C. J. (2004). Natural variation of drug susceptibility in wild-type human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(2), 437-443.
- Patel, D., Antwi, J., Koneru, P. C., Serrao, E., Forli, S., Kessl, J. J., Feng, L., Deng, N., Levy, R. M., Fuchs, J. R., Olson, A. J., Engelman, A. N., Bauman, J. D., Kvaratskhelia, M., & Arnold, E. (2016). A New

- Class of Allosteric HIV-1 Integrase Inhibitors Identified by Crystallographic Fragment Screening of the Catalytic Core Domain. *The Journal of biological chemistry*, 291(45), 23569-23577. doi:10.1074/jbc.M116.753384
- Peeters, M., Chaix, M. L., & Delaporte, E. (2008). [Genetic diversity and phylogeographic distribution of SIV: how to understand the origin of HIV]. *Med Sci (Paris)*, 24(6-7), 621-628. doi:10.1051/medsci/20082467621
- Peeters, M., Gaye, A., Mboup, S., Badombena, W., Bassabi, K., Prince-David, M., Develoux, M., Liegeois, F., van der Groen, G., Saman, E., & Delaporte, E. (1996). Presence of HIV-1 group O infection in West Africa. *Aids*, 10(3), 343-344.
- Peeters, M., Liegeois, F., Torimiro, N., Bourgeois, A., Mpoudi, E., Vergne, L., Saman, E., Delaporte, E., & Saragosti, S. (1999). Characterization of a highly replicative intergroup M/O human immunodeficiency virus type 1 recombinant isolated from a Cameroonian patient. *Journal of virology*, 73(9), 7368-7375.
- Pefura-Yone, E. W., Soh, E., Kengne, A. P., Balkissou, A. D., & Kuaban, C. (2013). Non-adherence to antiretroviral therapy in Yaounde: prevalence, determinants and the concordance of two screening criteria. *Journal of infection and public health*, 6(4), 307-315. doi:10.1016/j.jiph.2013.02.003
- Pere, H., Roques, P., Talla, F., Meillo, H., Charpentier, C., & Belec, L. (2015). Sustained virological failure in Cameroonian patient infected by HIV-1 group N evidenced by sequence-based genotyping assay. *Aids*, 29(10), 1267-1269. doi:10.1097/qad.0000000000000704
- Perelson, A. S., Neumann, A. U., Markowitz, M., Leonard, J. M., & Ho, D. D. (1996). HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*, 271(5255), 1582-1586.
- Phia-projet. (2018). Cameroon population-based HIV impact assessment (CAMPHIA). Accessed 29 August 2018. Available from: https://phia.icap.columbia.edu/wp-content/uploads/2018/07/3471CAMPHIA_Cameroon-SS_A4_v13_requests_7.25.18.pdf.
- Philippe, M. (2018). <https://cns.sante.fr/actualites/prise-en-charge-du-vih-recommandations-du-groupe-dexperts/>.
- Pironti, A., Pfeifer, N., Walter, H., Jensen, B. O., Zazzi, M., Gomes, P., Kaiser, R., & Lengauer, T. (2017a). Using drug exposure for predicting drug resistance - A data-driven genotypic interpretation tool. *PLoS One*, 12(4), e0174992. doi:10.1371/journal.pone.0174992
- Pironti, A., Walter, H., Pfeifer, N., Knops, E., Lubke, N., Buch, J., Di Giambenedetto, S., Kaiser, R., & Lengauer, T. (2017b). Determination of Phenotypic Resistance Cutoffs From Routine Clinical Data. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, 74(5), e129-e137. doi:10.1097/qai.0000000000001198
- Plantier, J.-C., Leoz, M., Dickerson, J. E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemée, V., Damond, F., Robertson, D. L., & Simon, F. (2009). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature Medicine*, 15(8), 871-872. doi:10.1038/nm.2016
- Plantier, J. C., Dachraoui, R., Lemee, V., Gueudin, M., Borsa-Lebas, F., Caron, F., & Simon, F. (2005). HIV-1 resistance genotyping on dried serum spots. *AIDS*, 19(4), 391-397.

- Plantier, J. C., Djemai, M., Lemee, V., Reggiani, A., Leoz, M., Burc, L., Vessiere, A., Rousset, D., Poveda, J. D., Henquell, C., Gautheret-Dejean, A., & Barin, F. (2009a). Census and analysis of persistent false-negative results in serological diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 group O infections. *Journal of clinical microbiology*, *47*(9), 2906-2911. doi:10.1128/jcm.00602-09
- Plantier, J. C., Gueudin, M., Damond, F., Braun, J., Mauclore, P., & Simon, F. (2003). Plasma RNA quantification and HIV-1 divergent strains. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, *33*(1), 1-7.
- Plantier, J. C., Leoz, M., Dickerson, J. E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemee, V., Damond, F., Robertson, D. L., & Simon, F. (2009b). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature medicine*, *15*(8), 871-872. doi:10.1038/nm.2016
- Poeschla, E. M. (2008). Integrase, LEDGF/p75 and HIV replication. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, *65*(9), 1403-1424. doi:10.1007/s00018-008-7540-5
- Poveda, E., Barreiro, P., Rodes, B., & Soriano, V. (2005). Enfuvirtide is active against HIV type 1 group O. *AIDS research and human retroviruses*, *21*(6), 583-585. doi:10.1089/aid.2005.21.583
- Poveda, E., de Mendoza, C., Parkin, N., Choe, S., Garcia-Gasco, P., Corral, A., & Soriano, V. (2008). Evidence for different susceptibility to tipranavir and darunavir in patients infected with distinct HIV-1 subtypes. *Aids*, *22*(5), 611-616. doi:10.1097/QAD.0b013e3282f51eb9
- Preston, B. D., Poiesz, B. J., & Loeb, L. A. (1988). Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science*, *242*(4882), 1168-1171.
- Quinn, T. C., Wawer, M. J., Sewankambo, N., Serwadda, D., Li, C., Wabwire-Mangen, F., Meehan, M. O., Lutalo, T., & Gray, R. H. (2000). Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *N Engl J Med*, *342*(13), 921-929. doi:10.1056/nejm200003303421303
- Quinones-Mateu, M. E., Albright, J. L., Mas, A., Soriano, V., & Arts, E. J. (1998). Analysis of pol gene heterogeneity, viral quasispecies, and drug resistance in individuals infected with group O strains of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology*, *72*(11), 9002-9015.
- Rambaut, A., Robertson, D. L., Pybus, O. G., Peeters, M., & Holmes, E. C. (2001). Human immunodeficiency virus. Phylogeny and the origin of HIV-1. *Nature*, *410*(6832), 1047-1048. doi:10.1038/35074179
- Ratner, L., Gallo, R. C., & Wong-Staal, F. (1985). HTLV-III, LAV, ARV are variants of same AIDS virus. *Nature*, *313*(6004), 636-637.
- Rhee, S. Y., Varghese, V., Holmes, S. P., Van Zyl, G. U., Steegen, K., Boyd, M. A., Cooper, D. A., Nsanzimana, S., Saravanan, S., Charpentier, C., de Oliveira, T., Etiebet, M. A., Garcia, F., Goedhals, D., Gomes, P., Gunthard, H. F., Hamers, R. L., Hoffmann, C. J., Hunt, G., Jiamsakul, A., Kaleebu, P., Kanki, P., Kantor, R., Kerschberger, B., Marconi, V. C., D'Amour Ndahimana, J., Ndembu, N., Ngo-Giang-Huong, N., Rokx, C., Santoro, M. M., Schapiro, J. M., Schmidt, D., Seu, L., Sigaloff, K. C. E., Sirivichayakul, S., Skhosana, L., Sunpath, H., Tang, M., Yang, C., Carmona, S., Gupta, R. K., & Shafer, R. W. (2017). Mutational Correlates of Virological Failure in Individuals Receiving a WHO-Recommended Tenofovir-Containing First-Line Regimen: An International Collaboration. *EBioMedicine*, *18*, 225-235. doi:10.1016/j.ebiom.2017.03.024

- Robertson, D. L., Anderson, J. P., Bradac, J. A., Carr, J. K., Foley, B., Funkhouser, R. K., Gao, F., Hahn, B. H., Kalish, M. L., Kuiken, C., Learn, G. H., Leitner, T., McCutchan, F., Osmanov, S., Peeters, M., Pieniazek, D., Salminen, M., Sharp, P. M., Wolinsky, S., & Korber, B. (2000). HIV-1 nomenclature proposal. *Science*, *288*(5463), 55-56.
- Rodgers, M. A., Vallari, A. S., Harris, B., Yamaguchi, J., Holzmayer, V., Forberg, K., Berg, M. G., Kenmenge, J., Ngansop, C., Awazi, B., Mbanya, D., Kaptue, L., Brennan, C., Cloherty, G., & Ndembu, N. (2017). Identification of rare HIV-1 Group N, HBV AE, and HTLV-3 strains in rural South Cameroon. *Virology*, *504*, 141-151. doi:10.1016/j.virol.2017.01.008
- Roques, P., Robertson, D. L., Souquiere, S., Apetrei, C., Nerrienet, E., Barre-Sinoussi, F., Muller-Trutwin, M., & Simon, F. (2004). Phylogenetic characteristics of three new HIV-1 N strains and implications for the origin of group N. *AIDS*, *18*(10), 1371-1381.
- Roques, P., Robertson, D. L., Souquiere, S., Damond, F., Ayouba, A., Farfara, I., Depienne, C., Nerrienet, E., Dormont, D., Brun-Vezinet, F., Simon, F., & Mauciere, P. (2002). Phylogenetic analysis of 49 newly derived HIV-1 group O strains: high viral diversity but no group M-like subtype structure. *Virology*, *302*(2), 259-273.
- Rose, J. D., Rhea, A. M., Weber, J., & Quinones-Mateu, M. E. (2009). Current tests to evaluate HIV-1 coreceptor tropism. *Current opinion in HIV and AIDS*, *4*(2), 136-142. doi:10.1097/COH.0b013e328322f973
- Rouet, F., Chaix, M. L., Nerrienet, E., Ngo-Giang-Huong, N., Plantier, J. C., Burgard, M., Peeters, M., Damond, F., Ekouevi, D. K., Msellati, P., Ferradini, L., Rukobo, S., Marechal, V., Schwachsa, N., Wakrim, L., Rafalimanana, C., Rakotoambinina, B., Viard, J. P., Seigneurin, J. M., & Rouzioux, C. (2007). Impact of HIV-1 genetic diversity on plasma HIV-1 RNA Quantification: usefulness of the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA second-generation long terminal repeat-based real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction test. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, *45*(4), 380-388. doi:10.1097/QAI.0b013e3180640cf5
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, *4*(4), 406-425. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454
- Sakalian, M., Parker, S. D., Weldon, R. A., Jr., & Hunter, E. (1996). Synthesis and assembly of retrovirus Gag precursors into immature capsids in vitro. *Journal of virology*, *70*(6), 3706-3715.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *74*(12), 5463-5467.
- Santos, A. F., & Soares, M. A. (2010). HIV Genetic Diversity and Drug Resistance. *Viruses*, *2*(2), 503-531. doi:10.3390/v2020503
- Sax, P. E., DeJesus, E., Crofoot, G., Ward, D., Benson, P., Dretler, R., Mills, A., Brinson, C., Peloquin, J., Wei, X., White, K., Cheng, A., Martin, H., & Quirk, E. (2017). Bicitgravir versus dolutegravir, each with emtricitabine and tenofovir alafenamide, for initial treatment of HIV-1 infection: a randomised, double-blind, phase 2 trial. *The lancet. HIV*, *4*(4), e154-e160. doi:10.1016/s2352-3018(17)30016-4
- Sharp, P. M., & Hahn, B. H. (2011). Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *1*(1), a006841. doi:10.1101/cshperspect.a006841

- Sheehy, A. M., Gaddis, N. C., Choi, J. D., & Malim, M. H. (2002). Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature*, *418*(6898), 646-650. doi:10.1038/nature00939
- Shi, J., Zhou, J., Shah, V. B., Aiken, C., & Whitby, K. (2011). Small-molecule inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infection by virus capsid destabilization. *Journal of virology*, *85*(1), 542-549. doi:10.1128/jvi.01406-10
- Simon, F., Ly, T. D., Baillou-Beaufils, A., Fauveau, V., De Saint-Martin, J., Loussert-Ajaka, I., Chaix, M. L., Saragosti, S., Courouge, A. M., Ingrand, D., & et al. (1994). Sensitivity of screening kits for anti-HIV-1 subtype O antibodies. *Aids*, *8*(11), 1628-1629.
- Simon, F., Mauclore, P., Roques, P., Loussert-Ajaka, I., Muller-Trutwin, M. C., Saragosti, S., Georges-Courbot, M. C., Barre-Sinoussi, F., & Brun-Vezinet, F. (1998). Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med*, *4*(9), 1032-1037. doi:10.1038/2017
- Simon, F., Souquiere, S., Damond, F., Kfutwah, A., Makuwa, M., Leroy, E., Rouquet, P., Berthier, J. L., Rigoulet, J., Lecu, A., Telfer, P. T., Pandrea, I., Plantier, J. C., Barre-Sinoussi, F., Roques, P., Muller-Trutwin, M. C., & Apetrei, C. (2001). Synthetic peptide strategy for the detection of and discrimination among highly divergent primate lentiviruses. *AIDS research and human retroviruses*, *17*(10), 937-952. doi:10.1089/088922201750290050
- Singh, A. R., Hill, R. L., & Lingappa, J. R. (2001). Effect of mutations in Gag on assembly of immature human immunodeficiency virus type 1 capsids in a cell-free system. *Virology*, *279*(1), 257-270. doi:10.1006/viro.2000.0706
- Skhosana, L., Steegen, K., Bronze, M., Lukhwareni, A., Letsoalo, E., Papathanasopoulos, M. A., Carmona, S. C., & Stevens, W. S. (2015). High prevalence of the K65R mutation in HIV-1 subtype C infected patients failing tenofovir-based first-line regimens in South Africa. *PLoS one*, *10*(2), e0118145. doi:10.1371/journal.pone.0118145
- Song, E. Y., Hur, M., Roh, E. Y., Park, M. H., Moon, H. W., & Yun, Y. M. (2012). Performances of four fourth-generation human immunodeficiency virus-1 screening assays. *Journal of medical virology*, *84*(12), 1884-1888. doi:10.1002/jmv.23423
- Soriano, V., Gutierrez, M., Garcia-Lerma, G., Aguilera, O., Mas, A., Bravo, R., Perez-Labad, M. L., Baquero, M., & Gonzalez-Lahoz, J. (1996). First case of HIV-1 group O infection in Spain. *Vox sanguinis*, *71*(1), 66.
- Strebel, K. (2013). HIV accessory proteins versus host restriction factors. *Current opinion in virology*, *3*(6), 692-699. doi:10.1016/j.coviro.2013.08.004
- Sullivan, P. S., Do, A. N., Ellenberger, D., Pau, C. P., Paul, S., Robbins, K., Kalish, M., Storck, C., Schable, C. A., Wise, H., Tetteh, C., Jones, J. L., McFarland, J., Yang, C., Lal, R. B., & Ward, J. W. (2000). Human immunodeficiency virus (HIV) subtype surveillance of African-born persons at risk for group O and group N HIV infections in the United States. *The Journal of infectious diseases*, *181*(2), 463-469. doi:10.1086/315254
- Swanson, P., Harris, B. J., Holzmayer, V., Devare, S. G., Schochetman, G., & Hackett, J., Jr. (2000). Quantification of HIV-1 group M (subtypes A-G) and group O by the LCx HIV RNA quantitative assay. *J Virol Methods*, *89*(1-2), 97-108.

- Tagnouokam Ngoupo, P. A., Sadeuh-Mba, S. A., De Oliveira, F., Ngo-Malabo, E. T., Ngono, L., Plantier, J. C., Kfutwah, A., & Njouom, R. (2018). Short Communication: Characterization of a New HIV-1 Group N Isolate Originating from a Cameroonian Patient. *AIDS research and human retroviruses*, *34*(7), 621-625. doi:10.1089/aid.2018.0015
- Takehisa, J., Zekeng, L., Ido, E., Yamaguchi-Kabata, Y., Mboudjeka, I., Harada, Y., Miura, T., Kaptu, L., & Hayami, M. (1999). Human immunodeficiency virus type 1 intergroup (M/O) recombination in cameroon. *Journal of virology*, *73*(8), 6810-6820.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, *30*(12), 2725-2729. doi:10.1093/molbev/mst197
- Tang, J., Jones, S. A., Jeffrey, J. L., Miranda, S. R., Galardi, C. M., Irlbeck, D. M., Brown, K. W., McDanal, C. B., & Johns, B. A. (2017). Discovery of a novel and potent class of anti-HIV-1 maturation inhibitors with improved virology profile against gag polymorphisms. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *27*(12), 2689-2694. doi:10.1016/j.bmcl.2017.04.042
- Tang, M. W., & Shafer, R. W. (2012). HIV-1 antiretroviral resistance: scientific principles and clinical applications. *Drugs*, *72*(9), e1-25. doi:10.2165/11633630-000000000-00000
- Taylor, B. S., Sobieszczyk, M. E., McCutchan, F. E., & Hammer, S. M. (2008). The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med*, *358*(15), 1590-1602. doi:10.1056/NEJMra0706737
- Tebit, D. M., Lobritz, M., Lalonde, M., Immonen, T., Singh, K., Sarafianos, S., Herchenroder, O., Krausslich, H. G., & Arts, E. J. (2010). Divergent evolution in reverse transcriptase (RT) of HIV-1 group O and M lineages: impact on structure, fitness, and sensitivity to nonnucleoside RT inhibitors. *Journal of virology*, *84*(19), 9817-9830. doi:10.1128/jvi.00991-10
- Tejiokem, M. C., Faye, A., Penda, I. C., Guemkam, G., Ateba Ndongo, F., Chewa, G., Rekacewicz, C., Rousset, D., Kfutwah, A., Boisier, P., & Warszawski, J. (2011). Feasibility of early infant diagnosis of HIV in resource-limited settings: the ANRS 12140-PEDIACAM study in Cameroon. *PLoS One*, *6*(7), e21840. doi:10.1371/journal.pone.0021840
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, *22*(22), 4673-4680.
- Tongo, M., Martin, D. P., Zembe, L., Mpoudi-Ngole, E., Williamson, C., & Burgers, W. A. (2013). Characterization of HIV-1 gag and nef in Cameroon: further evidence of extreme diversity at the origin of the HIV-1 group M epidemic. *Virology journal*, *10*, 29. doi:10.1186/1743-422X-10-29
- Torimiro, J. N., D'Arrigo, R., Takou, D., Nanfack, A., Pizzi, D., Ngong, I., Carr, J. K., Joseph, F. P., Perno, C. F., & Cappelli, G. (2009). Human immunodeficiency virus type 1 intersubtype recombinants predominate in the AIDS epidemic in Cameroon. *The new microbiologica*, *32*(4), 325-331.
- Toth, G., & Borics, A. (2006a). Closing of the flaps of HIV-1 protease induced by substrate binding: a model of a flap closing mechanism in retroviral aspartic proteases. *Biochemistry*, *45*(21), 6606-6614. doi:10.1021/bi060188k
- Toth, G., & Borics, A. (2006b). Flap opening mechanism of HIV-1 protease. *Journal of molecular graphics & modelling*, *24*(6), 465-474. doi:10.1016/j.jmgm.2005.08.008

- UNAIDS. (2012). http://www.unaids.org/en/resources/campaigns/20121120_globalreport2012/globalreport/.
- Vallari, A., Bodelle, P., Ngansop, C., Makamche, F., Ndembi, N., Mbanya, D., Kaptue, L., Gurtler, L. G., McArthur, C. P., Devare, S. G., & Brennan, C. A. (2010). Four new HIV-1 group N isolates from Cameroon: Prevalence continues to be low. *AIDS research and human retroviruses*, 26(1), 109-115. doi:10.1089/aid.2009.0178
- Vallari, A., Holzmayer, V., Harris, B., Yamaguchi, J., Ngansop, C., Makamche, F., Mbanya, D., Kaptue, L., Ndembi, N., Gurtler, L., Devare, S., & Brennan, C. A. (2011). Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. *Journal of virology*, 85(3), 1403-1407. doi:10.1128/jvi.02005-10
- Van Baelen, K., Salzwedel, K., Rondelez, E., Van Eygen, V., De Vos, S., Verheyen, A., Steegen, K., Verlinden, Y., Allaway, G. P., & Stuyver, L. J. (2009). Susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 to the maturation inhibitor bevirimat is modulated by baseline polymorphisms in Gag spacer peptide 1. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(5), 2185-2188. doi:10.1128/aac.01650-08
- Van Heuverswyn, F., Li, Y., Neel, C., Bailes, E., Keele, B. F., Liu, W., Loul, S., Butel, C., Liegeois, F., Bienvenue, Y., Ngolle, E. M., Sharp, P. M., Shaw, G. M., Delaporte, E., Hahn, B. H., & Peeters, M. (2006). Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature*, 444(7116), 164. doi:10.1038/444164a
- Van Laethem, K., De Munter, P., Schrooten, Y., Verbesselt, R., Van Ranst, M., Van Wijngaerden, E., & Vandamme, A. M. (2007). No response to first-line tenofovir+lamivudine+efavirenz despite optimization according to baseline resistance testing: impact of resistant minority variants on efficacy of low genetic barrier drugs. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 39(1), 43-47. doi:10.1016/j.jcv.2007.02.003
- Van Maele, B., Busschots, K., Vandekerckhove, L., Christ, F., & Debyser, Z. (2006). Cellular co-factors of HIV-1 integration. *Trends in biochemical sciences*, 31(2), 98-105. doi:10.1016/j.tibs.2005.12.002
- Vergne, L., Bourgeois, A., Mpoudi-Ngole, E., Mougnotou, R., Mbuagbaw, J., Liegeois, F., Laurent, C., Butel, C., Zekeng, L., Delaporte, E., & Peeters, M. (2003). Biological and genetic characteristics of HIV infections in Cameroon reveals dual group M and O infections and a correlation between SI-inducing phenotype of the predominant CRF02_AG variant and disease stage. *Virology*, 310(2), 254-266. doi:10.1016/s0042-6822(03)00167-3
- Vergne, L., Peeters, M., Mpoudi-Ngole, E., Bourgeois, A., Liegeois, F., Toure-Kane, C., Mboup, S., Mulanga-Kabeya, C., Saman, E., Jourdan, J., Reynes, J., & Delaporte, E. (2000). Genetic diversity of protease and reverse transcriptase sequences in non-subtype-B human immunodeficiency virus type 1 strains: evidence of many minor drug resistance mutations in treatment-naive patients. *Journal of clinical microbiology*, 38(11), 3919-3925.
- Vessiere, A., Leoz, M., Brodard, V., Strady, C., Lemee, V., Depatureaux, A., Simon, F., & Plantier, J. C. (2010a). First evidence of a HIV-1 M/O recombinant form circulating outside Cameroon. *AIDS*, 24(7), 1079-1082. doi:10.1097/QAD.0b013e3283355659
- Vessiere, A., Rousset, D., Kfutwah, A., Leoz, M., Depatureaux, A., Simon, F., & Plantier, J. C. (2010b). Diagnosis and monitoring of HIV-1 group O-infected patients in Cameroun. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, 53(1), 107-110. doi:10.1097/QAI.0b013e3181b97ec1

- Villabona-Arenas, C. J., Domyeum, J., Mouacha, F., Butel, C., Delaporte, E., Peeters, M., Mpoudi-Ngole, E., & Aghokeng, A. F. (2015). HIV-1 group O infection in Cameroon from 2006 to 2013: Prevalence, genetic diversity, evolution and public health challenges. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. doi:10.1016/j.meegid.2015.09.006
- Visseaux, B., Damond, F., Matheron, S., Descamps, D., & Charpentier, C. (2018). Corrigendum to "HIV-2 molecular epidemiology" [Infect. Genet. Evol. 46 (2016) 233-240]. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 58, 294. doi:10.1016/j.meegid.2017.12.024
- Wallis, C. L., Mellors, J. W., Venter, W. D., Sanne, I., & Stevens, W. (2010). Varied patterns of HIV-1 drug resistance on failing first-line antiretroviral therapy in South Africa. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, 53(4), 480-484. doi:10.1097/QAI.0b013e3181bc478b
- Weber, I. T., Miller, M., Jaskolski, M., Leis, J., Skalka, A. M., & Wlodawer, A. (1989). Molecular modeling of the HIV-1 protease and its substrate binding site. *Science*, 243(4893), 928-931.
- Wei, X., Ghosh, S. K., Taylor, M. E., Johnson, V. A., Emini, E. A., Deutsch, P., Lifson, J. D., Bonhoeffer, S., Nowak, M. A., Hahn, B. H., & et al. (1995). Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature*, 373(6510), 117-122. doi:10.1038/373117a0
- Weiss, K. K., Chen, R., Skasko, M., Reynolds, H. M., Lee, K., Bambara, R. A., Mansky, L. M., & Kim, B. (2004). A role for dNTP binding of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase in viral mutagenesis. *Biochemistry*, 43(15), 4490-4500. doi:10.1021/bi035258r
- Wensing, A. M., Calvez, V., Gunthard, H. F., Johnson, V. A., Paredes, R., Pillay, D., Shafer, R. W., & Richman, D. D. (2014). 2014 Update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Topics in antiviral medicine*, 22(3), 642-650.
- Wertheim, J. O., Leigh Brown, A. J., Hepler, N. L., Mehta, S. R., Richman, D. D., Smith, D. M., & Kosakovsky Pond, S. L. (2014). The global transmission network of HIV-1. *The Journal of infectious diseases*, 209(2), 304-313. doi:10.1093/infdis/jit524
- Wertheim, J. O., & Worobey, M. (2009). Dating the age of the SIV lineages that gave rise to HIV-1 and HIV-2. *PLoS computational biology*, 5(5), e1000377. doi:10.1371/journal.pcbi.1000377
- Whitcomb, J. M., Parkin, N. T., Chappey, C., Hellmann, N. S., & Petropoulos, C. J. (2003). Broad nucleoside reverse-transcriptase inhibitor cross-resistance in human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates. *The Journal of infectious diseases*, 188(7), 992-1000. doi:10.1086/378281
- WHO. (2013). Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. Recommendations for a public health approach. Accessed 15 March 2016. Available from: <http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/arv2013/en/>.
- WHO. (2015). Guideline on when to start antiretroviral therapy and on pre-exposure prophylaxis for HIV. Accessed 15 March 2016. Available from: <http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/earlyrelease-arv/en/>.
- WHO. (2017). Global action plan on HIV drug resistance 2017–2021. Accessed 15 March 2017. Available from: <http://www.who.int/hiv/pub/drugresistance/hivdr-action-plan-2017-2021/en/>.

- WHO. (2018). Accessed 22 August 2019. Available from: <http://www.who.int/hiv/fr/>.
- WHO. (2020). Accessed 11 August 2020. Available from: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>.
- Winters, B., Montaner, J., Harrigan, P. R., Gazzard, B., Pozniak, A., Miller, M. D., Emery, S., van Leth, F., Robinson, P., Baxter, J. D., Perez-Elias, M., Castor, D., Hammer, S., Rinehart, A., Vermeiren, H., Van Craenenbroeck, E., & Bachelier, L. (2008). Determination of clinically relevant cutoffs for HIV-1 phenotypic resistance estimates through a combined analysis of clinical trial and cohort data. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, 48(1), 26-34. doi:10.1097/QAI.0b013e31816d9bf4
- Worobey, M., Gemmel, M., Teuwen, D. E., Haselkorn, T., Kunstman, K., Bunce, M., Muyembe, J. J., Kabongo, J. M., Kalengayi, R. M., Van Marck, E., Gilbert, M. T., & Wolinsky, S. M. (2008). Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature*, 455(7213), 661-664. doi:10.1038/nature07390
- Yamaguchi, J., Bodelle, P., Vallari, A. S., Coffey, R., McArthur, C. P., Schochetman, G., Devare, S. G., & Brennan, C. A. (2004). HIV infections in northwestern Cameroon: identification of HIV type 1 group O and dual HIV type 1 group M and group O infections. *AIDS research and human retroviruses*, 20(9), 944-957. doi:10.1089/0889222042222755
- Yamaguchi, J., Coffey, R., Vallari, A., Ngansop, C., Mbanya, D., Ndembi, N., Kaptue, L., Gurtler, L. G., Bodelle, P., Schochetman, G., Devare, S. G., & Brennan, C. A. (2006a). Identification of HIV type 1 group N infections in a husband and wife in Cameroon: viral genome sequences provide evidence for horizontal transmission. *AIDS research and human retroviruses*, 22(1), 83-92. doi:10.1089/aid.2006.22.83
- Yamaguchi, J., McArthur, C. P., Vallari, A., Coffey, R., Bodelle, P., Beyeme, M., Schochetman, G., Devare, S. G., & Brennan, C. A. (2006b). HIV-1 Group N: evidence of ongoing transmission in Cameroon. *AIDS research and human retroviruses*, 22(5), 453-457. doi:10.1089/aid.2006.22.453
- Yang, C., Dash, B. C., Simon, F., van der Groen, G., Pieniazek, D., Gao, F., Hahn, B. H., & Lal, R. B. (2000). Detection of diverse variants of human immunodeficiency virus-1 groups M, N, and O and simian immunodeficiency viruses from chimpanzees by using generic pol and env primer pairs. *The Journal of infectious diseases*, 181(5), 1791-1795. doi:10.1086/315439
- Yarchoan, R., & Broder, S. (1987). Development of antiretroviral therapy for the acquired immunodeficiency syndrome and related disorders. A progress report. *N Engl J Med*, 316(9), 557-564. doi:10.1056/nejm198702263160925
- Zhang, F. H., Debnath, B., Xu, Z. L., Yang, L. M., Song, L. R., Zheng, Y. T., Neamati, N., & Long, Y. Q. (2017). Discovery of novel 3-hydroxypicolinamides as selective inhibitors of HIV-1 integrase-LEDGF/p75 interaction. *European journal of medicinal chemistry*, 125, 1051-1063. doi:10.1016/j.ejmech.2016.10.045
- Zhao, J., Tang, S., Ragupathy, V., Gaddam, D., Wang, X., Zhang, P., Nyambi, P. N., & Hewlett, I. (2012). CRF22_01A1 is involved in the emergence of new HIV-1 recombinants in Cameroon. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, 60(4), 344-350. doi:10.1097/QAI.0b013e318258c7e3
- Zouhair, S., Roussin-Bretagne, S., Moreau, A., Brunet, S., Laperche, S., Maniez, M., Barin, F., & Harzic, M. (2006). Group o human immunodeficiency virus type 1 infection that escaped detection in

two immunoassays. *Journal of clinical microbiology*, 44(2), 662-665.
doi:10.1128/jcm.44.2.662-665.2006

Annexes

Annexe 1 : Amorces spécifique VIH-1/M et O utilisées pour la caractérisation des VIH non M et des doubles infections VIH-1/M+O

Région	Etape	Amorces	Séquences (5'.....3')	Taille (pb)	Références		
VIH-1/M	PR	Externe	5'Prot1 (s) 3'Prot1 (as)	TAATTTTTTAGGGAAGATCTGGCCTTCC GCAAATACTGGAGTATTGTATGGATTTTCAGG	653	(Plantier <i>et al.</i> , 2005)	
		Interne	5'Prot2 (s) 3'Prot2 (as)	TCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCA AATGCTTTTATTTTTCTTCTGTCAATGGC	515		
	TI	Externe	MJ3 (s) MJ4 (as)	AGTAGGACCTACACCTGTCA CTGTTAGTGCTTTGGTTCCCTCT	941	(Heyndrickx <i>et al.</i> , 1998)	
		Interne	A35 (s) NE1 (as)	TTGGTTGCACTTTAAATTTTCCCATTAGTCCTATT CCTACTAACTTCTGTATGTCATTGACAGTCCAGCT	805		
	IN	Externe	4235 (s) 4538 (as)	CCCTACAATCCCCAAAGTCAAGG TACTGCCCTTCACCTTTCCA	324	(Dachraoui <i>et al.</i> , 2008)	
		Interne	4241M (s) 4481M (as)	TAGAATCTATGAATAAAGAATTAAGAA GCTGTCCCTGTAATAAACCCG	239		
	Gp41	Externe	1S (s) AS (as)	TGGAGGAGGAGATATGAGG GTGAGTATCCCTGCCTAACTCTAT	731	(Heyndrickx <i>et al.</i> , 1998)	
		Interne	T20S1 (s) 2AS (as)	GAGGGACAATTGGAGAAGTGAATT CTACCAAGCCTCCTACTATC	656		
	VIH-1/O	Pol (PR-TI)	Externe	ProtO (U) PolOL1 (as)	TTCAAYTGTGGRAAAGAGGGAC CTAATTCCTTGATAGATTTGACT	1399	(Vessiere <i>et al.</i> , 2010b)
			PR	Interne	Prot4O (s) NouvLO (as)	CAGCCCCACCRATGGAGG CATTGTTTTACTTTTGGTCCAT	
TI		Interne	PolOF1 (s) PolOL2 (as)	CAGTATTRGTGGGACCTACTCCTGTT GGCTGTAAGTGTCCAYTTGTCTG	805		
		IN	Externe	4235 (s) 4538 (as)	CCCTACAATCCCCAAAGTCAAGG TACTGCCCTTCACCTTTCCA	324	
Interne			4241O (s) 4391 O (as)	TAGAAGCCATGAATAAGGAATTAATAATC TTTGTAATTCTGTTGTTTGTATTTGTGA	192		
Gp41		Externe	V3Dura (s) Gp41NE3 (as)	ATTCCAATACTACTATTGTGCTCCA TAAGTTGCTCAAGAGGTGGTA	1698	(Vessiere <i>et al.</i> , 2010b)	
		Interne	OFU (s) 8393 (as)	TAAAACCTTTTAGTGTRGCAC GTTGATATCCCTGCCTAATG	675		

s : sens, as : anti-sens

Annexe 2 : Amorces pour les (RT-) PCRs non spécifiques VIH-1 et VIH-2 pour la caractérisation du N

Région	Etape	Amorces	Séquences (5'.....3')	Taille (pb)	Références
Gp41	Externe	GP40F1 (s)	TCTTAGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGG	585	(Yang <i>et al.</i> , 2000)
		GP41R1 (as)	AACGACAAAGGTGAGTATCCCTGCCTAA		
	Interne	GP46F2 (s)	ACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAACAGCA	447	
		GP48R2 (as)	TCCTACTATCATTATGAATATTTTTATATA		
IN	Externe	POL M 4150 U22 (s)	CATGGGTICCAGCHCAYAARGG	826	Non publié
		POLORB (as)	ACTGCHCCTTCHCCTTTCCA		
	Interne	POL M (s)	CCAGCHCAYAAAGGIATAGGDGG	649	
		POLR2 (as)	CCCAATCCCCCCTTTTCTTTTAAAATT		
		UNIPOL2B (as)	CCCCTATTCCTCCCYTTCTTTTAA		

s: sens ; as : anti-sens

Annexe 3 : Amorces spécifiques pour les (RT-) PCR VIH-2

Région	Etape	Amorces	Séquences (5'.....3')	Taille (pb)	Références
PR	Externe	DP20 mod (s)	GACAGAGGACTTGCTGCA	879	
		PoL2 3478L20 (as)	ARGATRTCATCCATGTAYTG		
	Interne	HI-2GAG 2U (s)	TTGCTGCACCTCAATTCTCTC	533	
		PPRT2 mod (as)	TCTATYAGCATYCTCCATTTTRT		
TI	Externe	516 U (s)	ACCCAATMAAYATTTTTGGCAGAA	1291	
		517L (as)	GGATCCATGTYACYTGCCAGTA		
	Interne	518 U (s)	AAAGAGATYTGTAARATGGA	969	
		519L (as)	TTTRAYCTTTGCATATTTYCCTACT		

s : sens ; as : anti sens

Annexe 4 : Algorithme d'interprétation génotypique des mutations associées à la résistance ; ANRS 2017, V27

Pour les références confère : <http://www.hivfrenchresistance.org>.

September 2017- Version n°27

ANRS - AC 11: RESISTANCE GROUP GENOTYPE INTERPRETATION: NUCLEOSIDE AND NUCLEOTIDE REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS

	Mutations associated with resistance	Mutations associated with « possible resistance »
ZDV	<ul style="list-style-type: none"> • T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F [1, 2, 3, 4] • At least 3 mutations among: M41L, D67N, K70R, L210W, K219Q/E [1, 2, 3, 4] • Q151M • Insertion at codon 69 	
3TC/FTC	<ul style="list-style-type: none"> • K65R [11, 12, 16] • M184V/I • Insertion at codon 69 	<ul style="list-style-type: none"> • Q151M
ddl	<ul style="list-style-type: none"> • At least a score of + 2 among: M41L + T69D + 215Y/F + K219Q/E – K70R – M184V/I [5, 14, 15, 17, 18] • K65R [11, 12] • L74V/I [19] • Q151M • Insertion at codon 69 	
d4T	<ul style="list-style-type: none"> • V75A/W/S/T • T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F [6] • At least 3 mutations among: M41L, D67N, K70R, L210W, K219Q/E [4, 7, 14, 15] • K65R [30, 31, 32] • Q151M • Insertion at codon 69 	
ABC	<ul style="list-style-type: none"> • At least 3 mutations among: M41L, D67N, M184V/I, L210W, T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F [8, 19, 29] • K65R [9, 11, 12] • L74V/I [24, 25, 26, 27, 28, 29] • Y115F • Q151M • Insertion at codon 69 	<ul style="list-style-type: none"> • 2 mutations among: M41L, D67N, L210W, T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F [8, 19, 29] • M184V/I [36]
TDF/TAF	<ul style="list-style-type: none"> • At least 4 mutations among: M41L, E44D, D67N, T69D/N/S, L74V/I, L210W, T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F [13, 20, 33, 37, 38] • K65R/E/N [9, 10, 11, 12, 34, 35, 37, 38] • Insertion at codon 69 • K70E [21, 22, 23] 	<ul style="list-style-type: none"> • 3 mutations among: M41L, E44D, D67N, T69D/N/S, L74V/I, L210W, T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F [13, 33, 37, 38]

ZDV: zidovudine, 3TC: lamivudine, FTC: emtricitabine, ddl: didanosine, d4T: stavudine, ABC: abacavir, TDF: tenofovir, TAF: tenofovir alafenamide

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

**ANRS - AC 11: RESISTANCE GROUP
GENOTYPE INTERPRETATION: NON-NUCLEOSIDE REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS**

	Mutations associated with resistance	Mutations associated with « possible resistance »
EFV	<ul style="list-style-type: none"> • L100I • K101E • K103H/N/S/T [1] • V106M [2] • E138K [12, 13] • Y181C/I • Y188C/L • G190A/C/E/Q/S/T/V • P225H • M230L 	
NVP	<ul style="list-style-type: none"> • A98S (for HIV-1 subtype C only) [3] • L100I • K101E • K103H/N/S/T [1] • V106A/M [2] • Y181C/I • Y188C/H/L • G190A/C/E/Q/S/T/V • M230L 	<ul style="list-style-type: none"> • E138K [13]
ETR	<ul style="list-style-type: none"> • At least 3 among: V90I, A98G, L100I, K101E/H/W/P/R, V106I, V179D/F/I/L/M/T, G190A/S, M230L [4, 7, 8, 9, 10, 11] • E138K [12, 13] • Y181C/I/V [5, 6] • H221Y [12,16] 	<ul style="list-style-type: none"> • 2 mutations among: V90I, A98G, L100I, K101E/H/W/P/R, V106I, V179D/F/I/L/M/T, G190A/S, M230L [4, 7, 8, 9, 10, 11] • E138A/G/Q/R/S [5, 6, 7, 8]
RPV	<ul style="list-style-type: none"> • K101E/P [9, 13] • E138A/G/K/Q/R/S [12, 13, 14] • V179L [9] • Y181C/I/V [13] • Y188L [9] • F227C [9] • H221Y [13] • M230I/L/V [9] • L100I + K103N/S [9, 15] • L100I + K103R + V179D [15] 	<ul style="list-style-type: none"> • V179D [9,15, 17]

EFV: efavirenz, NVP: nevirapine, ETR: etravirine, RPV : rilpivirine

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

**ANRS - AC 11: RESISTANCE GROUP
GENOTYPE INTERPRETATION: PROTEASE INHIBITORS**

	Mutations associated with resistance	Mutations associated with « possible resistance »
IDV	<ul style="list-style-type: none"> • M46I/L • V82A/F/M/S/T [11] • I84A/V [8] • L90M and at least 2 among: K20M/R, L24I, V32I, M36I, I54V/L/M/T, A71V/T, G73S/A, V77I 	<ul style="list-style-type: none"> • L90M
SQV/RTV 1000/100 mg BID	<ul style="list-style-type: none"> • G48V • At least 3 mutations among: L10F/I/M/R/V, I15A/V, K20I/M/R/T, L24I, I62V, G73S/T, V82A/F/S/T, I84V, L90M [9] 	<ul style="list-style-type: none"> • 2 mutations among: L10F/I/M/R/V, I15A/V, K20I/M/R/T, L24I, I62V, G73S/T, V82A/F/S/T, I84V, L90M [9]
NFV	<ul style="list-style-type: none"> • D30N • I84A/V [8] • N88S/D • L90M 	<ul style="list-style-type: none"> • V82A/F/S/T and at least 2 among: L10I, M36I, M46I/L, I54V/L/M/T, A71V/T, V77I [1]
LPV/r	<ul style="list-style-type: none"> • At least 4 mutations among: L10F/I/R/V, K20M/R, L24I, L33F, M46I/L, I50V, F53L, I54M/L/T/V, L63P, A71I/L/V/T, V82A/F/S/T, I84V, L90M [3, 4, 5, 21] • I47A [15, 16] • L76V [18, 19] 	<ul style="list-style-type: none"> • 3 mutations among: L10F/I/R/V, K20M/R, L24I, L33F, M46I/L, I50V, F53L, I54M/L/T/V, L63P, A71I/L/V/T, V82A/F/S/T, I84V, L90M [3, 4, 5, 21]
FPV/RTV 700/100 mg BID	<ul style="list-style-type: none"> • I50V • V32I and I47A/V [2, 13, 14] • At least 4 mutations among: L10F/I/V, L33F, M36I, I54A/L/M/S/T/V, I62V, V82A/C/F/G, I84V, L90M [2, 20] 	
ATV/RTV 300/100 mg QD	<ul style="list-style-type: none"> • I50L [6] • N88S [28,29,30] • At least 3 mutations among: L10F/I/V, G16E, L33F/I/V, M46I/L, D60E, A71V/T, I84V, I85V, L90M [7, 12, 22, 31] 	<ul style="list-style-type: none"> • 2 mutations among: L10F/I/V, G16E, L33F/I/V, M46I/L, D60E, A71V/T, I84V, I85V, L90M [7, 12, 22, 31]
TPV/RTV 500/200 mg BID	<ul style="list-style-type: none"> • At least a score of + 3*: 36I/L/V – 53L/W/Y + 58E + 69I/K/N/Q/R/Y + 89I/M/R/T/V [10, 23] 	<ul style="list-style-type: none"> • A score of + 2*: 36I/L/V – 53L/W/Y + 58E + 69I/K/N/Q/R/Y + 89I/M/R/T/V [10, 23]

September 2017- Version n°27

DRV/RTV** 600/100 mg BID	<ul style="list-style-type: none"> At least 4 mutations among: V11I, V32I, L33F, I47V, I50V, I54L/M, T74P, L76V, I84V, L89V [17, 24, 25, 26, 27] 	<ul style="list-style-type: none"> 3 mutations among: V11I, V32I, L33F, I47V, I50V, I54L/M, T74P, L76V, I84V, L89V [17, 24, 25, 26, 27]
800/100 mg QD	<ul style="list-style-type: none"> 2 mutations among: V11I, V32I, L33F, I47V, I50V, I54L/M, T74P, L76V, I84V, L89V [17, 24, 25, 26, 27] 	

IDV: indinavir, SQV: saquinavir, NFV: nelfinavir, RTV: ritonavir, FPV: fosamprenavir, LPV: lopinavir, ATV:atazanavir, TPV: tipranavir, DRV : darunavir

* Insufficient data for HIV-1 subtype non-B

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

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

Annexes 5 : Autorisation administrative du CPC

REPUBLIQUE DU CAMEROUN Paix - Travail - Patrie	 MINISTRE	REPUBLIC OF CAMEROON Peace - Work - Fatherland
 CENTRE PASTEUR DU CAMEROUN « L'Excellence en Biologie accessible à tous »		Yaoundé, le 16 Avril 2015
Dr Richard NJOUOM Chef Service de Virologie, Centre Pasteur du Cameroun		
	A	
	Mme Elodie Téclaire NGO MALABO, Etudiante en Doctorat Ph.D	
Objet : Autorisation de recherche		
<p>Le Chef de Service de Virologie du Centre Pasteur du Cameroun (CPC), soussigné, Dr Richard NJOUOM, Autorise Mme Elodie Téclaire NGO MALABO, étudiante en Doctorat Ph.D à l'Université de Yaoundé I et en stage au Service de Virologie du CPC, à utiliser les données des patients reçus en routine dans ce Service pour une demande de diagnostic VIH et de test de résistance aux antirétroviraux dans le cadre de ses travaux de recherche portant sur le thème : « Caractérisation Virologique des variants de VIH circulant au Cameroun : diversité génétique et résistance aux antirétroviraux ».</p>		
<p>En foi de quoi, la présente autorisation de recherche est établie et délivrée pour servir et valoir partout ce que de droit.</p>		
	Dr Richard NJOUOM	
	 Chef Service de Virologie Centre Pasteur du Cameroun	
<small>CENTRE PASTEUR DU CAMEROUN - Laboratoire National de Référence et de Santé Publique Membre du Réseau International des Instituts Pasteur BP 1274 YAOUNDE CAMEROUN - Internet : www.pasteur-yaounde.org Tel : (237) 22 23 10 15 / 22 23 18 03 - Télécopie : (237) 22 23 15 54 - cpo@pasteur-yaounde.org</small>		

Annexes 6 : Considération éthique EDS

COMITE NATIONAL D'ETHIQUE DE LA RECHERCHE POUR LA SANTE HUMAINE

Arrêté N° 0977/A/MINSANTE/SESP/SG/DROS/ du 18 avril 2012 portant création, organisation et fonctionnement des comités d'éthique de la recherche pour la santé humaine au sein des structures relevant du Ministère en charge de la santé publique

N° 2013/03/~~087~~/L/CNERSH/SP

Yaoundé, 21 mars 2013

Cnethique_minsante@yahoo.fr

CLAIRANCE ETHIQUE

Le Comité National d'Éthique de la Recherche pour la Santé Humaine (CNERSH), en sa session du 21 mars 2013, a examiné le projet de recherche intitulé « **Epidémiologie des hépatites virales B, C et delta au Cameroun : analyse des échantillons de l'enquête démographique de santé 2011** » soumis par le Docteur **DIJOUOM Richard**, Investigateur Principal (Centre Pasteur du Cameroun).

Le projet est d'un grand intérêt scientifique et médical. La procédure de recherche décrit clairement toutes les étapes de l'étude. Les responsables de l'enquête démographique de santé avaient obtenu une clairance éthique dans le cadre de l'enquête qui a permis la collecte des échantillons qui vont être utilisés dans cette étude. La confidentialité des données est assurée dans le document. Les CVs des investigateurs les décrivent comme des chercheurs expérimentés, compétents, capables de mener à bien cette étude. Pour toutes ces raisons, le Comité National d'Éthique approuve, pour une durée de deux ans, la mise en œuvre de la présente version du protocole.

Le Docteur **DIJOUOM Richard** est responsable du respect scrupuleux du protocole approuvé et ne devrait y apporter aucun amendement aussi mineur soit-il sans avis favorable du CNERSH. L'investigateur est appelé à collaborer pour toute descente du CNERSH pour suivi de la mise en œuvre du protocole approuvé. Le rapport final du projet devra être soumis au CNERSH et aux autorités sanitaires du Cameroun

La présente clairance peut être retirée en cas de non respect de la réglementation en vigueur et des recommandations sus-mentionnées.

En foi de quoi, la présente clairance éthique est délivrée pour servir et valoir ce que de droit

Ampliations

- MINSANTE



PRESIDENT

Dr Lazare KAPTUE

N.B : cette clairance éthique ne vous dispense pas de l'autorisation administrative de recherche (AAR), exigée pour mener cette étude sur le territoire Camerounais. Cette dernière vous sera délivrée par la Division de la Recherche Opérationnelle en Santé (DROS) du Ministère de la Santé Publique.

Annexes 7 : Communications et articles

Annexes 7 (1) : Communications

a) *Communication orales*

- ✓ **Elodie Ngo-Malabo**, Paul Alain Ngoupo, Serge Alain Sadeuh-Mba, Emmanuel Akongwi, Laure Ngono, Charles Bilong-Bilong, Anfumbom Kfutwah, Richard Njouom. Emergence de la résistance au Ténofovir chez les patients infectés par le VIH pris en charge au Cameroun. III^e édition des Journées Scientifiques du Centre Pasteur du Cameroun - 28-30 Septembre 2016, Yaoundé, Cameroun
- ✓ **Elodie Teclaire Ngo Malabo**, Paul Alain Ngoupo, Serge Saeuh-Mba, Laure Ngono, Charles Félix Bilong-Bilong, Anfumbom Kfutwah, Richard Njouom. Augmentation de la résistance au TENOFOVIR chez les patients infectés par le VIH et en échec de première ligne de traitement au Cameroun à la suite des recommandations de l'OMS en 2013. 9^e Conférence Internationale Francophone VIH/ Hépatites (AFRAVIH 2018), Bordeaux du 4 au 7 avril 2018.
- ✓ Paul Alain Tagnouokam Ngoupo, Serge Alain Sadeuh-Mba, Fabienne De Oliveira, **Elodie Téclaire Ngo-Malabo**, Laure Ngono, Jean-Christophe Plantier, Anfumbom Kfutwah, Richard Njouom. Caractérisation d'un nouveau groupe N isolé HIV-1 originaire d'un patient camerounais. 9^e Conférence Internationale Francophone VIH/ Hépatites (AFRAVIH 2018), Bordeaux, France, du 4 au 7 avril 2018.
- ✓ **Ngo-Malabo Elodie Teclaire**, Tagnouokam Ngoupo PA, Sadeuh-Mba SA, Ngono L, Njouom R. Increased use of Tenofovir concurs with increased resistance on First line HIV treatment in Cameroon between 2014 and 2016 following the WHO 2013 recommendations. International Scientific Symposium Institut Pasteur International Network, Paris, France, November 15-16th, 2018.
- ✓ **Elodie Teclaire Ngo-Malabo**, Paul Alain Ngoupo, Serge Alain Sadeuh-Mba, Laure Ngono, Charles Félix Bilong-Bilong, Anfumbom Kfutwah, Richard Njouom. Evolution des proportions relatives des différents variants du VIH circulant au Cameroun de 2010 à 2016. Premières journées scientifiques de l'Institut Pasteur de Bangui, RCA, du 28-29 Novembre 2018.

b) *Communications affichées (posters)*

- ✓ Ingrid Bertille Mouli, **Elodie Ngo Malabo**, Emmanuel Akongwi, Frederic Lissock, Laure Ngono, Paul Alain Ngoupo, Richard Njouom. Etude du profil de résistance aux antirétroviraux chez les patients reçus en routine au Centre Pasteur du Cameroun. Premières Journées Scientifiques de l'Institut Pasteur de Bangui, Bangui, RCA du 28-29 Novembre 2018.

Annexes 7 (2) : Articles

- ✓ **Elodie Teclaire Ngo-Malabo**, Paul Alain Ngoupo T., Martin Zekeng, Valérie Ngono, Laure Ngono, Serge Alain Sadeuh-Mba, Richard Njouom and Anfumbom Kfutwah. A cheap and open HIV viral load technique applicable in routine analysis in a resource limited setting with a wide HIV genetic diversity. *Virology Journal* (2017) 14:224
- ✓ **Elodie Teclaire Ngo-Malabo**, Paul Alain Ngoupo, Serge Alain Sadeuh-Mba, Emmanuel Akongwi, Robert Banaï, Laure Ngono, Richard Njouom, Charles Felix Bilong-Bilong, Anfumbom Kfutwah. HIV Drug Resistance Testing in a Resource Limited Setting with High

Viral Diversity: The First Twenty Eight Months Experience, *Current HIV Research* (2017), 15, 297-305.

- ✓ Tagnouokam Ngoupo PA, Sadeuh-Mba SA, De Oliveira F, **Ngo-Malabo ET**, Ngonon L, Plantier JC, Kfutwah A, Njouom R. Short Communication: Characterization of a New HIV-1 Group N Isolate Originating from a Cameroonian Patient. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2018; 34:621-25. **I**