

13

Résistance du VIH-1 aux antirétroviraux

La résistance aux antirétroviraux est liée à la sélection de quasi-espèces virales comportant des mutations dans les gènes de la transcriptase inverse, de la protéase, de la gp41 ou de l'intégrase, lorsque la réplication virale persiste en présence d'antirétroviraux. La sélection de mutations de résistance dépend de facteurs pharmacologiques (concentrations plasmatiques suboptimales d'antirétroviral consécutives à des difficultés d'observance ou à des interactions médicamenteuses), de la puissance du traitement antiviral et de la « barrière génétique » du virus vis-à-vis des différents antirétroviraux, c'est-à-dire du nombre de mutations virales qui permet au virus d'être résistant. Ce chapitre ne concerne que la résistance aux antirétroviraux des VIH-1 du groupe M. La résistance aux antirétroviraux des VIH-1 du groupe O et VIH-2 est traitée dans le chapitre 12.

MÉCANISMES DE LA RÉSISTANCE

Les mutations diminuent la sensibilité des virus aux antirétroviraux par des mécanismes différents selon les classes et même selon l'antirétroviral dans une même classe [1, 2].

Inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI)

Deux mécanismes différents sont impliqués dans la résistance aux inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques.

- L'excision de l'analogue nucléosidique déjà incorporé est conférée par les mutations appelées TAM (*thymidine analog mutations*). Elles sont sélectionnées séquentiellement par les analogues de la thymidine, zidovudine et stavudine, et comprennent : M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F et K219Q/E. Ces mutations favorisent l'accès de l'ATP au site de polymérisation qui réagit avec l'analogue nucléosidique en le détachant de la chaîne d'ADN viral en formation. Les TAM sont responsables d'une résistance à l'ensemble des INTI, sauf à la lamivudine, et cela à des niveaux divers. Cette résistance croisée est variable en fonction du nombre de TAM et de l'INTI. Par ailleurs, les mutations K70R et K219Q/E ont moins d'impact que les quatre autres dans cette résistance croisée. La mutation M184V, en présence de TAM, augmente la résistance in vivo à l'abacavir et n'a pas d'impact sur le ténofovir et la didanosine.

- La diminution d'incorporation des nucléosides ou nucléotides artificiels au profit de nucléotides naturels est observée avec certaines mutations. Ainsi, la mutation M184V est

sélectionnée par la lamivudine et l'emtricitabine. Ce même mécanisme est décrit pour la mutation Q151M et son complexe (mutations A62V, V75I, F77L, F116Y), ainsi que pour les mutations L74V, K65R et K70E. La mutation Q151M entraîne une résistance de haut niveau à tous les INTI, sauf au ténofovir et à la lamivudine. La mutation L74V est sélectionnée par la didanosine et l'abacavir (en association fréquente avec la M184V) et la mutation K65R et K70E principalement par le ténofovir. L'impact de cette mutation K65R semble nul sur les analogues de la thymidine (la zidovudine est l'INTI de choix en présence de K65R), certain sur le ténofovir lui-même et probable (avec des niveaux probablement variables) sur les autres nucléosides. La prévalence de cette mutation reste très faible dans les bases de données en dépit d'une utilisation désormais très répandue du ténofovir avec l'emtricitabine [3]. En revanche, cette mutation est fréquemment sélectionnée lors de l'utilisation de combinaisons d'INTI qui ne sont pas recommandées (abacavir et/ou didanosine associés au ténofovir sur des virus dépourvus de TAM). L'abacavir en association à la lamivudine sélectionne en priorité la mutation L74V/I avec une fréquence plus importante quand cette combinaison est donnée en une fois par jour et en association aux INNTI.

Il faut noter que, dans cette classe d'antirétroviraux, la barrière génétique est variable selon les molécules, et en particulier très faible pour la lamivudine et l'emtricitabine.

Il existe de plus en plus de preuves de l'existence de mutations conférant une résistance aux INTI localisées dans des régions qui ne sont pas analysées par les tests génotypiques de résistance pratiqués en routine. En effet, des mutations localisées dans la région de connexion et dans la RNase H peuvent conférer une résistance aux INTI, mais aussi aux INNTI [4, 5].

Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI)

Ces molécules bloquent la transcriptase inverse (TI) en se fixant au niveau d'une poche hydrophobique étroite et proche du site actif de l'enzyme. Une seule mutation à ce niveau peut entraîner une résistance de haut niveau à l'INNTI avec une résistance croisée entre l'efavirenz et la névirapine. Ce sont typiquement des molécules dont la « barrière génétique » est basse puisqu'une seule mutation leur confère une résistance élevée.

Des INNTI de deuxième génération comme l'étravirine sont actifs sur certains virus ayant des profils de résistance aux INNTI classiques [6]. Il a été montré que la mutation K103N n'avait aucun impact délétère sur la réponse virologique à l'étravirine et que la mutation Y181C n'était associée à une diminution de la réponse virologique qu'en présence d'autres mutations dans cette classe [7]. De plus, l'accumulation de mutations de résistance aux INNTI diminue fortement l'efficacité de l'étravirine : il est donc recommandé de ne pas laisser persister de réplication résiduelle sous efavirenz ou névirapine, qui entraîne rapidement l'accumulation de mutations de résistance aux INNTI et réduit les possibilités de traitement ultérieur par l'étravirine.

Inhibiteurs de protéase (IP)

La résistance aux IP est liée à des mutations situées, d'une part, au niveau du site actif de l'enzyme et, d'autre part, à distance de celui-ci. La résistance aux IP est un phénomène graduel avec accumulation progressive de mutations. On distingue les mutations primaires sélectionnées les premières lors d'un échappement, très souvent situées au niveau du site actif de l'enzyme, et les mutations secondaires, qui s'accumuleront et renforceront la résistance. Certaines de ces mutations primaires sont spécifiques d'un IP ; c'est le cas de la mutation I50L sélectionnée par l'atazanavir chez des patients naïfs, qui, *in vitro*, n'entraîne pas de résistance croisée avec les autres IP. Chez des patients ayant déjà reçu d'autres IP, d'autres mutations vont être sélectionnées par l'atazanavir, en particulier la mutation I84V responsable de résistance croisée aux IP. Les autres IP, comme l'indinavir, le

saquinavir et le lopinavir, peuvent sélectionner des mutations responsables de résistance croisée, en particulier les mutations V82A/F/S/T, I84V/A et L90M, qui, lorsqu'elles sont associées, rendent difficile le choix d'un traitement de relais.

De nombreuses études montrent qu'il existe une grande différence entre les IP potentialisés par le ritonavir et les IP non potentialisés, en termes de fréquence de sélection de mutations de résistance chez les patients naïfs d'antirétroviraux. Les échappements aux IP non potentialisés s'accompagnent, dans un certain nombre de cas, de mutations de résistance (50 p. 100 des cas avec le nelfinavir, 16 p. 100 des cas avec l'atazanavir). En revanche, les échappements aux IP potentialisés qui ont pu être analysés chez les patients naïfs s'accompagnent de très peu de sélection de mutations dans la protéase. Il est donc recommandé de toujours prescrire des IP potentialisés par le ritonavir (IP/r).

Les études de résistance menées lors des essais de monothérapie d'IP/r montrent une plus grande fréquence de résistance avec ce type de stratégie [8], qui n'est donc pas recommandée.

La notion de barrière génétique forte mérite d'être nuancée ; en effet, certaines mutations isolées peuvent être associées à un échec virologique, même au cours d'une première ligne d'un IP/r.

Parmi les nouveaux IP, le tipranavir (TPV) semble sélectionner chez les patients pré-traités des mutations également sélectionnées par beaucoup d'autres IP (par exemple, V82L/T et I84V) qui sont responsables de résistance croisée [9]. Il existe également un certain degré de résistance croisée entre fosamprénavir et darunavir :

- le darunavir peut sélectionner chez les patients pré-traités des mutations également sélectionnées par le fosamprénavir (V32I, I47V, I50V, I54M/L, L76V, I84V), du fait de leur structure chimique très proche. Des travaux ont identifié les mutations qui ont le plus d'impact sur la résistance au darunavir quand celui-ci est utilisé chez des patients pré-traités [10] ;

- une autre étude a montré que l'utilisation de fosamprénavir était associée, en comparaison à l'utilisation des autres IP, à une sélection plus fréquente de mutations agissant sur la réponse au darunavir [11].

Chez les patients naïfs d'antirétroviraux traités par darunavir dans l'essai Artemis, aucune mutation de résistance n'a été observée au moment de l'échec. Cependant, les données concernant les patients naïfs en échec de darunavir sont encore trop limitées pour permettre de décrire les mutations de résistance sélectionnées dans la protéase dans cette situation.

Des études récentes montrent qu'il existe des mutations dans le gène *gag*, au niveau des sites de clivage ou à proximité, qui semblent conférer une résistance aux IP ; cependant, elles ne sont pas systématiquement analysées par les tests génotypiques classiques qui ne séquentent que la protéase virale [12].

Inhibiteurs d'entrée et tests de tropisme

Inhibiteurs d'entrée

La résistance à l'enfuvirtide, inhibiteur de fusion, est associée à des changements des acides aminés 36 à 45 du domaine HR-1 de la gp41. Ces mutations apparaissent rapidement (en quelques semaines) en cas de réplication virale sous enfuvirtide. Des mutations sont sélectionnées plus tardivement dans HR-2, mais ces mutations n'ont pas d'impact sur la résistance à l'enfuvirtide et sont probablement compensatrices des mutations de HR-1 pour la capacité répliquative. Il a été montré que les mutations dans la gp41 s'accumulent en cas de réplication résiduelle prolongée sous enfuvirtide. Il n'existe pas de résistance croisée entre l'enfuvirtide et d'autres inhibiteurs d'entrée tels que les inhibiteurs de CCR5.

De petites molécules inhibitrices de l'interaction gp120-CCR5, tels que le maraviroc et le vicriviroc (actuellement évaluées par des études de phase III), sont des antagonistes

allostériques non compétitifs qui se lient au même site que la gp120 sur le co-récepteur CCR5 [13]. L'utilisation du maraviroc a été validée chez des patients prétraités dont le virus présente un tropisme R5. In vitro, la résistance au maraviroc est liée à des changements de la gp120 qui permettent à l'enveloppe virale de s'attacher au complexe CCR5-maraviroc. Plusieurs mutations associées à la résistance au maraviroc et au vicriviroc ont été décrites dans le gène *env*, principalement dans la boucle V3 [14]. Peu d'isolats cliniques résistants au maraviroc ont été étudiés [15]. La résistance semble associée à des mutations de la boucle V3, variables d'un isolat à l'autre, avec une fréquence particulière de substitutions aux positions 13 et 26. Les données sont actuellement insuffisantes pour conclure sur la résistance croisée entre le maraviroc et le vicriviroc. En clinique, les échappements thérapeutiques aux inhibiteurs de CCR5 ont été attribués le plus souvent à l'émergence de virus de tropisme CXCR4, préexistant au traitement mais non détectés par les tests de tropisme [16]. Lors des échappements thérapeutiques sous maraviroc, on observe souvent une sélection des virus R5/X4 ou X4 pour lesquels plusieurs études de cohorte ont montré une progression plus rapide ; l'identification du tropisme viral lors des échappements thérapeutiques est donc justifiée.

Tests de tropisme

Du fait de leur mécanisme d'action très spécifique, les antagonistes de CCR5 ne sont actifs que sur les virus de tropisme R5 et inactifs sur les virus avec un tropisme mixte R5/X4 ou purement X4. Il est donc nécessaire, avant de prescrire ces molécules, d'identifier la nature du co-récepteur en réalisant un test de tropisme. Les études cliniques évaluant l'efficacité du maraviroc ont été menées à l'aide du test phénotypique de tropisme de la société Monogram (Trophile®). Des tests génotypiques pourraient également permettre de prédire le tropisme viral à partir de la séquence de l'enveloppe virale. L'interprétation des tests se fait par des algorithmes déterminés par des techniques de bio-informatique (PSSM, Geno2Pheno2, 11/25). La spécificité et la sensibilité de détermination des virus X4 ou R5/X4 par ces techniques génotypiques sont bonnes quand plusieurs de ces algorithmes sont utilisés simultanément. En effet, une étude récente montre qu'avec cette technique les tests génotypiques présentent une concordance globale de 91 p. 100 avec les tests phénotypiques. De plus, les valeurs prédictives positives et négatives pour identifier les virus R5/X4 ou X4 sont respectivement de 87 et 92 p. 100 [17-19]. À l'instar des algorithmes d'interprétation des tests génotypiques de résistance, les algorithmes de détermination du tropisme seront régulièrement évalués et adaptés par les virologues du groupe Résistance de l'ANRS (AC11). Par ailleurs, la détermination génotypique du tropisme viral sera incluse dès 2008 dans le contrôle de qualité des tests génotypiques de résistance.

Inhibiteurs d'intégrase

Les inhibiteurs de l'intégrase du VIH-1 bloquent l'intégration de l'ADN viral dans l'ADN chromosomique de la cellule et donc la réplication virale. Cette intégration est divisée en plusieurs étapes, chacune pouvant être bloquée indépendamment des autres : 1) formation du complexe enzyme/ADN viral ; 2) préparation des extrémités 3' de l'ADN viral double brin par l'intégrase ; 3) import du complexe de pré-intégration du cytoplasme vers le noyau de la cellule infectée ; 4) intégration de l'ADN viral dans l'ADN génomique (transfert de brin) ; 5) réparation de l'ADN après intégration. Ce sont les inhibiteurs de l'intégrase agissant en bloquant l'intégration de l'ADN viral dans l'ADN cellulaire (étape 4) de la classe des dikéto-acides (DKA) qui sont les plus développés, et seules deux de ces molécules ont été évaluées dans des essais cliniques chez des patients infectés par le VIH-1. Le raltégravir (Isentress®) bénéficie d'une AMM alors que l'élvitgravir est en cours de développement.

La résistance aux inhibiteurs d'intégrase est due à la sélection et à l'émergence, sous traitement, de variants viraux initialement minoritaires, portant des mutations de résistance.

In vivo, deux profils distincts comportant soit la mutation N155H, soit la mutation Q148K/R/H, associées à une ou plusieurs mutations secondaires, ont été mis en évidence en cas d'échappement virologique au raltégravir. Cependant, d'autres profils moins fréquents peuvent également être associés à la résistance [20].

En ce qui concerne l'élvitégravir, différents profils peuvent être sélectionnés, notamment l'E92Q ou N155H [21]. Il existe une résistance croisée très importante entre raltégravir et élvitégravir. La sélection de mutations de résistance au raltégravir est principalement observée quand celui-ci est utilisé dans une combinaison d'antirétroviraux ne comportant aucune autre molécule pleinement active.

La barrière génétique de cette famille est faible et une seule mutation peut induire d'emblée une résistance complète à ces molécules. Il convient donc d'être très vigilant et de n'autoriser aucune répllication résiduelle sous traitement comportant un inhibiteur d'intégrase.

TESTS DE RÉSISTANCE

Tests génotypiques de résistance

Description

Les tests génotypiques permettent d'analyser les mutations présentes dans les gènes de la transcriptase inverse, de la protéase, de l'intégrase, de la boucle V3 ou de la gp41. Après PCR, le séquençage des gènes avec migration électrophorétique sur séquenceurs automatiques est la technique de référence. Des logiciels traduisent les séquences nucléotidiques en acides aminés. La lecture s'effectue en analysant chaque position connue comme associée à des mutations de résistance, par rapport à une séquence de référence ; la population virale à ce codon peut être sauvage, mutée ou mixte.

Deux kits de séquençage sont actuellement disponibles, qui incluent un logiciel d'analyse des profils de mutations : les kits des firmes Bayer (Trugene® HIV-1 Genotyping Kit) et Abbott (Perkin Elmer ABI ViroSeq Genotyping System) ont reçu l'agrément d'utilisation de l'Agence française de sécurité sanitaire et de la Food and Drug Administration aux États-Unis. Ces deux kits donnent des résultats concordants dans 97,8 p. 100 des cas analysés. Un grand nombre de laboratoires utilisent d'autres techniques de séquençage avec différentes méthodes dont celle du groupe Résistance AC11 de l'ANRS décrite sur le site <http://www.hivfrenchresistance.org>. Les résultats de cette dernière méthode sont corrélés à ceux des techniques commercialisées. Les tests génotypiques de séquençage nécessitent de longues manipulations puisqu'un technicien à temps plein en réalise environ vingt par semaine.

Il faut souligner que le séquençage, qui est la technique standard génotypique, ne permet d'analyser que la population virale majoritaire représentant au moins 20 à 30 p. 100 de la population virale totale circulante dans le plasma. Les techniques de détection des populations virales minoritaires sortent actuellement du cadre de la pratique clinique et sont réservées aux protocoles de recherche (*voir plus loin*).

Dans les essais prospectifs qui ont évalué leur intérêt, les tests génotypiques apportent un bénéfice par rapport à la seule utilisation des données cliniques et thérapeutiques pour le choix d'une association antirétrovirale en cas d'échappement virologique. La décision de modification thérapeutique basée sur les tests génotypiques semble avoir un impact plus grand sur la réponse virologique chez les patients dont la durée d'exposition préalable aux antirétroviraux n'est pas trop importante. La valeur prédictive des tests génotypiques est d'autant meilleure que des concentrations plasmatiques efficaces d'IP et une bonne observance au traitement sont présentes chez les patients.

Un contrôle de qualité des tests génotypiques, organisé par le groupe Résistance AC11 de l'ANRS, est réalisé chaque année depuis 2001 et concerne actuellement une cinquantaine de laboratoires, incluant des laboratoires de ville. La fréquence de résultats faussement positifs (mutation de résistance retrouvée alors que la séquence est sauvage) est basse, mais celle de faux négatifs (mutation de résistance non détectée) est plus élevée. Cette sous-estimation des mutations de résistance est rapportée dans d'autres contrôles de qualité en Europe. Le contrôle de qualité a un rôle pédagogique important, comme l'a montré l'augmentation des performances des laboratoires depuis son instauration [22]. Depuis 2007, le contrôle de qualité s'effectue sous l'égide du centre national de référence sur la résistance aux antirétroviraux.

Interprétation des tests génotypiques

Construction des algorithmes

Établir des règles d'interprétation des tests génotypiques ou « algorithmes » est un exercice long, difficile, nécessitant des mises à jour répétées. En l'absence de données cliniques sont d'abord prises en compte les mutations sélectionnées par culture du virus en présence de l'antirétroviral. Puis, l'étude des corrélations entre tests phénotypiques et génotypiques utilisant des isolats cliniques bien caractérisés permet d'explorer les résistances croisées et l'impact phénotypique des mutations. Ensuite, les algorithmes intègrent les mutations sélectionnées chez les patients traités par la molécule étudiée. Mais les algorithmes doivent être « cliniquement validés » pour être pertinents. De tels algorithmes reposent sur des études de corrélation entre le profil de mutations avant la mise sous traitement et la réponse virologique vis-à-vis de l'antirétroviral analysé [23].

Les algorithmes du groupe Résistance de l'ANRS AC11 évoluent en fonction des données disponibles réactualisées tous les 6 à 12 mois et sont présents sur les sites internet (<http://www.hivfrenchresistance.org> et <http://hivdb.stanford.edu>). Un groupe international s'est mis en place pour construire des algorithmes avec une méthodologie standardisée, à partir de plusieurs bases de données regroupées (<http://hivforum.org/projects/standardization.html>).

Il faut noter que les listes de mutations associées à la résistance aux antirétroviraux et publiées par le panel international IAS-USA ne constituent pas des algorithmes et ne sont pas utilisables pour les études épidémiologiques [24].

Rendu des résultats

Les résultats des tests génotypiques sont habituellement présentés par des logiciels auxquels des règles d'interprétation ont été transmises. Pour chaque antirétroviral, le résultat est exprimé avec la mention « résistance » ou « résistance possible » ou « sans évidence de résistance ». Le GSS (*genotypic sensitivity score*) représente la somme des médicaments actifs selon l'algorithme utilisé et présents dans un régime thérapeutique. La prédictivité de ce score pour la réponse thérapeutique a été montrée dans plusieurs essais.

Des études ont montré des variations dans l'interprétation de l'activité d'un antirétroviral entre les différents algorithmes développés. Cette variation est plus importante pour la stavudine, la didanosine, l'abacavir et l'amprénavir [25, 26]. Il faut souligner que la comparaison entre les algorithmes est encore compliquée par les différences dans l'expression des résultats. Ainsi l'interprétation en « résistance possible » peut-elle avoir des significations variées selon les molécules.

Il est indispensable que le premier rendu du résultat du génotype de résistance s'accompagne de l'identification du sous-type viral par l'analyse phylogénétique de la séquence génétique de la transcriptase inverse.

Il est important de considérer la ré-interprétation des résultats de tests génotypiques antérieurs avec les algorithmes les plus récents.

Tests phénotypiques de résistance

Trois firmes proposent des tests phénotypiques avec une technique utilisant des virus recombinants : le test Antivirogram® de Virco, PhenoSense® de Monogram et Phenoscript® d'Eurofins Scientific.

Les résultats des tests phénotypiques sont exprimés par le rapport entre la CI_{50} ou CI_{90} (concentration inhibitrice 50 ou 90 p. 100) de la souche du patient et celle d'un isolat sensible de référence. La détermination des valeurs seuils de ce rapport, correspondant à une réelle diminution de sensibilité phénotypique, pose des problèmes difficiles. Ces valeurs seuils ont d'abord été définies par rapport à la variabilité de la technique qui diffère selon les molécules. Les firmes ont ensuite utilisé des valeurs seuils « biologiques », dérivées de la distribution des CI_{50} ou CI_{90} d'isolats provenant de patients naïfs de traitement. Mais le problème clé, commun aux tests phénotypiques et génotypiques, est de pouvoir prédire la réponse virologique d'un patient à une molécule donnée. Ainsi, des valeurs seuils définies « cliniquement » sont plus pertinentes. Elles sont établies à partir de l'analyse des résultats d'essais cliniques permettant de définir la valeur au-delà de laquelle la réponse virologique du patient est significativement réduite. Les valeurs seuils cliniques sont définies pour la plupart des molécules, en nombre variable selon les firmes.

Au total, les tests phénotypiques n'ont pas montré de bénéfice clinique pour la prise en charge des patients, mais restent aujourd'hui un outil indispensable (AI) à l'évaluation de nouvelles molécules.

Phénotype virtuel

Le phénotype « virtuel » est une interprétation du génotype : phénotype « estimé » à partir des données de génotype d'isolat d'un patient, apparié à des génotypes semblables pour lesquels les phénotypes sont connus et enregistrés dans une base de données. Les résultats du phénotype virtuel sont rendus comme une estimation calculée d'un phénotype théorique. Cette interprétation, proposée par la firme Virco, pose les mêmes problèmes d'interprétation que le phénotype réel, en particulier pour les INTI, et n'est que progressivement applicable aux nouvelles molécules. De plus, sa fiabilité peut être mise en doute quand le profil génotypique est rare, avec pour conséquence un faible nombre de phénotypes correspondant analysables dans la base de données. Les valeurs seuils cliniques ont été déterminées pour la plupart des molécules. Actuellement, il n'est pas recommandé dans la pratique clinique en France.

RÉSISTANCE ET VIH-1 DE SOUS-TYPES « NON-B »

Du point de vue de la résistance aux antirétroviraux, plusieurs questions se posent : quel est l'impact du polymorphisme sur la résistance virale ? Les VIH-1 de sous-type non-B ont-ils une voie d'évolution vers la résistance différente de celle des virus de sous-type B ?

Sur le gène de la protéase, de nombreuses mutations sélectionnées par les antirétroviraux sur des virus de sous-type B sont polymorphiques, c'est-à-dire déjà présentes à l'état naturel sur les virus des patients naïfs de traitement et infectés par des virus de sous-type non-B. Ainsi peut-on observer des substitutions au niveau des codons impliqués dans la résistance aux antirétroviraux des sous-types B, considérées comme des mutations majeures ou primaires. Par exemple, l'acide aminé au codon 82 des virus sauvages du sous-type G est une isoleucine (I) et non pas une valine (V) comme pour les virus sauvages de sous-type B ; cette isoleucine entraînerait une réduction de sensibilité au saquinavir, à l'indinavir et au ritonavir. Par ailleurs, il existe un polymorphisme important des virus non-B au niveau des

sites de mutations secondaires ou mineures. L'impact de leur variation sur la sensibilité naturelle aux IP est encore assez peu connu, mais ces mutations sont de plus en plus prises en compte dans les algorithmes d'interprétation de la résistance. Ainsi la mutation K20M/R est-elle prise en compte dans l'algorithme de l'indinavir, du lopinavir, du fosamprénavir et du tipranavir (<http://www.hivfrenchresistance.org>). La mutation M36I, retrouvée dans plus de 80 p. 100 des virus CRF02_AG, est prise en compte dans l'algorithme de l'indinavir, du nelfinavir et du tipranavir. Dans l'algorithme utilisé pour le tipranavir, certaines mutations sont polymorphiques chez les virus non-B, laissant suggérer une moindre réponse de ces virus vis-à-vis de cette molécule [27].

La diversité génétique des VIH-1 peut aussi avoir des conséquences sur les voies génétiques utilisées par le virus pour acquérir une résistance aux antirétroviraux. Une mutation V106M est ainsi sélectionnée de manière préférentielle lors de l'exposition des virus de sous-type C aux INNTI, et cette mutation entraîne une résistance de haut niveau à cette classe d'antirétroviraux. Récemment, Brenner et al. ont montré l'émergence rapide d'une résistance phénotypique au ténofovir des virus de sous-type C [28]. En présence de ténofovir, le polymorphisme des codons 64, 65 et 66 de la transcriptase inverse des virus de sous-type C conduit à une sélection rapide de virus résistants porteurs de mutations K65R.

Lors des échecs de première ligne au nelfinavir, chez des patients infectés par des virus de sous-type B, la mutation D30N est la plus fréquente et n'entraîne pas de résistance croisée. Par contre, les virus de sous-types non-B (C, F, G et CRF01AE) sélectionnés lors de l'échec au nelfinavir sont porteurs d'autres mutations comme la mutation L90M entraînant une résistance croisée à d'autres IP [29, 30]. On a ici un exemple frappant de l'impact du sous-type viral sur l'efficacité et donc le choix de la molécule utilisée lors d'une première ligne de traitement.

En ce qui concerne les inhibiteurs de fusion, la susceptibilité à l'enfurvitide ne semble pas affectée, bien que la variabilité sur le gène de la gp41 soit importante entre les différents sous-types [31]. La sensibilité aux inhibiteurs d'intégrase semble équivalente quel que soit le sous-type car le site actif de l'enzyme est particulièrement bien conservé. Peu de données sont encore disponibles sur la sensibilité des isolats non-B aux antagonistes de CCR5.

RÉSISTANCE ET POPULATIONS VIRALES MINORITAIRES

Les tests de résistance actuellement utilisés en pratique clinique correspondent pour l'essentiel à des techniques de séquençage nucléotidique après amplification d'une partie du génome viral par RT-PCR à partir de l'ARN viral plasmatique. Ces méthodes de séquençage ne permettent pas la détection de sous-populations minoritaires au-dessous d'un seuil correspondant à 20 p. 100 de la population globale. Différentes méthodes ont été décrites pour la détection des variants résistants minoritaires : PCR spécifique d'allèle, séquençage à une copie (*single genome sequencing*), séquençage ultrasensible (*ultradeep sequencing*) ; ces méthodes permettent d'atteindre une sensibilité de 0,1 à 1 p. 100 pour la détection des variants minoritaires. Elles restent onéreuses. La PCR spécifique d'allèle est la moins coûteuse, mais elle nécessite une analyse séparée des différentes mutations, ce qui limite son intérêt en routine. Le séquençage ultrasensible paraît le plus prometteur, car il permet d'explorer des séquences génomiques ininterrompues ; il nécessite cependant une phase de mise au point et un appareillage très coûteux, qui rendent pour l'instant son accessibilité difficile.

La détection des variants minoritaires a été étudiée dans différentes situations cliniques [32, 33]. Différentes équipes ont retrouvé des variants minoritaires avec des prévalences proches de 30 p. 100 dans les populations étudiées, proches ou non de la séroconversion [34]. Il n'est pas clairement établi si ces variants sont transmis au moment de la primo-infection ou s'il s'agit de variations polymorphiques générées de novo comme le suggèrent

Kearney et al. [35]. La signification clinique de la détection des variants minoritaires avant traitement a été étudiée par plusieurs équipes avec des résultats contradictoires. Johnson et al. [36] ont mis en évidence une association entre la détection des variants minoritaires et la réponse virologique à la combinaison abacavir + lamivudine + efavirenz. En revanche, les données de la cohorte Aquitaine ne montrent pas d'association entre les variants minoritaires et la réponse virologique aux traitements de première ligne, alors même qu'une association entre la transmission de virus résistants majoritaires et une moins bonne réponse virologique est retrouvée dans cette étude. Des résultats similaires ont été retrouvés dans la cohorte des primo-infections de Zurich [37]. La signification clinique des variants minoritaires doit donc être étudiée, en utilisant des méthodes permettant la recherche de l'ensemble des mutations, comme le séquençage ultrasensible. En particulier, la question du seuil de sensibilité des techniques et de la définition de seuils pertinents vis-à-vis de la réponse virologique ultérieure devra être abordée.

ÉPIDÉMIOLOGIE DE LA RÉSISTANCE AUX ANTIRÉTROVIRAUX

En France, environ 50 p. 100 des patients diagnostiqués au cours de la primo-infection sont inclus chaque année dans l'étude de prévalence de la résistance.

Un des problèmes des études épidémiologiques sur la transmission de virus résistants est celui de leur représentativité. Ainsi en France, sur environ 5 000 nouvelles infections par le VIH par an, seules 300 environ sont diagnostiquées à la primo-infection. Il est peu probable que les patients diagnostiqués à la primo-infection soient représentatifs, sur le plan de la résistance, de tous les patients infectés à la même période. En France [38], les patients diagnostiqués au moment de la primo-infection sont plus jeunes, plus souvent des hommes homo- ou bisexuels, moins souvent originaires d'Afrique subsaharienne ou des départements français d'Amérique que les patients diagnostiqués à la phase chronique.

Ces différences ne sont sans doute pas dues à une évolution récente de l'épidémie, mais à des retards au diagnostic dans certains groupes et des recours au dépistage plus fréquents dans d'autres.

Les différences entre les études peuvent aussi s'expliquer par des pratiques thérapeutiques différentes dans les différents pays et aussi, bien sûr, par des différences dans les définitions de la résistance. La liste des mutations récemment publiée par Shafer et al. [39] a été développée spécifiquement pour l'étude de la transmission de la résistance, quel que soit le sous-type viral, et son utilisation doit être recommandée dans les études de transmission de la résistance.

Au cours de la primo-infection

Pour répondre à la question d'une éventuelle augmentation de transmission de virus résistants, une surveillance annuelle a été instaurée en France sous l'égide de l'ANRS. En 2005-2006, 385 patients ont pu être inclus, ce qui représente environ la moitié des primo-infections diagnostiquées en France et 5 p. 100 de l'ensemble des primo-infections. La fréquence de virus résistants à au moins un antirétroviral était de 10 p. 100 selon l'algorithme du groupe résistance de l'ANRS AC11 [40]. La résistance à au moins un antirétroviral d'une classe était de 8 p. 100. Les virus résistant aux INTI sont les plus fréquents (5,4 p. 100) avec surtout des virus résistant à la zidovudine ou à la stavudine (T215Y/F ou des mutants revertants) ; 4,4 p. 100 des virus étaient résistants aux INNTI (mutation K103N majoritaire) et 2 p. 100 l'étaient aux IP. La fréquence globale de 10 p. 100 est stable au cours du temps depuis 1996 [40, 41]. La fréquence (1,8 p. 100 en 2005-2006) de transmission de virus

résistants à au moins un antirétroviral de deux ou trois classes est également stable. Cette stabilité s'explique probablement par l'augmentation progressive au cours du temps du nombre de patients traités par HAART [40]. Le nombre de patients en échec virologique, potentiellement transmetteurs de virus résistants, diminue au cours du temps. En revanche, en 2005-2006, 20 p. 100 des patients sont porteurs de virus phylogénétiquement proches, ce qui peut laisser suggérer la transmission de virus au cours ou décours des primo-infections.

Aucune différence de fréquence de virus résistants n'a été retrouvée en fonction des groupes d'exposition. En revanche, nous notons depuis quelques années une augmentation significative de la transmission de virus de sous-types non-B résistants : 21 p. 100 en 2005-2006, 20 p. 100 en 2003-2004, 11 p. 100 en 2001-2002 et 0 p. 100 en 1999-2000 ($p = 0,05$). De ce fait, en 2005-2006, la fréquence de virus résistants est comparable chez les patients infectés par des virus de sous-type B (11 p. 100) et les patients infectés par des virus de sous-types non-B (8 p. 100).

Chez les patients chroniquement infectés non traités

Chez les patients ayant une infection chronique et naïfs de tout traitement antirétroviral, la prévalence globale de virus portant au moins une mutation de résistance est déterminée périodiquement dans le cadre de l'étude Odyssée initiée en 1998 [42, 43]. En 2006-2007, la prévalence globale de virus portant au moins une mutation de résistance aux antirétroviraux dans la protéase ou la transcriptase inverse était de 10,6 p. 100 (IC 95 p. 100 : 6,7-16,3). Ce taux de prévalence n'était pas statistiquement différent en fonction de la durée de la séropositivité. La prévalence de virus ayant au moins une mutation de résistance aux IP, INTI et INNTI était respectivement de 4,7, 5,8 et 2,8 p. 100. La prévalence de virus ayant au moins une mutation de résistance à une, deux et trois classes d'antirétroviraux est respectivement de 7,9, 2,5 et 0,1 p. 100 (IP + INTI : 2,2 p. 100). Les caractéristiques sociodémographiques des patients telles que le sexe, l'âge, le groupe et le pays de transmission de l'infection par le VIH ainsi que le stade clinique, le taux de lymphocytes CD4 et la charge virale VIH-1 plasmatique n'étaient pas associées à la présence de virus résistants.

La proportion de patients infectés par des virus de sous-types non-B a augmenté entre 2001 et 2006-2007, essentiellement en raison de l'augmentation de virus non-B autres que le CRF_02AG (33 p. 100 en 2001 versus 41,4 p. 100 en 2006-2007). Il n'a pas été mis en évidence de différence de prévalence de la résistance en fonction du sous-type viral.

La prévalence globale de la résistance a augmenté significativement entre 2001 et 2006-2007 (3,9 p. 100 en 2001 versus 10,6 p. 100 en 2006-2007), de même que la prévalence de la résistance aux IP (0,8 p. 100 en 2001 versus 4,7 p. 100 en 2006-2007) et aux INNTI (0,3 p. 100 en 2001 versus 2,8 p. 100 en 2006-2007). En revanche, l'augmentation observée avec les INTI n'est pas significative (3,3 p. 100 en 2001 versus 5,8 p. 100 en 2006-2007). La proportion de virus avec au moins une mutation de résistance à une et deux classes d'antirétroviraux a également augmenté. La prévalence de la résistance chez les patients naïfs justifie la réalisation de tests génotypiques de résistance avant l'initiation d'un traitement antirétroviral.

Chez les patients traités

En France en 2004, la prévalence de la résistance chez les patients traités par antirétroviraux et avec une charge virale détectable [42] était de 88 p. 100. Le nombre de nouveaux cas de résistance a diminué depuis 1996 du fait de l'efficacité accrue des traitements de première ligne avec, en corollaire, une augmentation du pourcentage de patients traités avec une charge virale inférieure à 50 copies/ml [43]. De même, dans la cohorte Suisse, la probabilité de résistance aux antirétroviraux sous traitement tend à se stabiliser, voire à diminuer [44].

INDICATIONS DES TESTS GÉNOTYPIQUES DE RÉSISTANCE

Les indications sont présentées dans le tableau 13-I. Les tests génotypiques doivent être effectués en cas d'échec virologique, alors que le patient est sous traitement antirétroviral. Au-dessous de 500 copies/ml, l'amplification génique est possible. L'intérêt de modifier rapidement la thérapie antirétrovirale après avoir constaté l'échec virologique est documenté par plusieurs publications qui montrent une accumulation de mutations de résistance quand le patient conserve la même thérapeutique malgré l'échec, même à des niveaux de charge virale relativement bas.

Un « blip » est défini par une élévation transitoire de l'ARN VIH plasmatique, en général de moins de 100 copies/ml, observée sur un seul prélèvement, et ne justifie pas la prescription d'un test de résistance.

L'interprétation des résultats d'un test génotypique de résistance et les choix thérapeutiques ultérieurs nécessitent souvent une concertation entre le clinicien, le virologue et le pharmacologue.

Tableau 13-I Indications des tests de résistance

Situation clinique	Recommandation (niveau de preuve)
Primo-infection et infection récente (< 6 mois)	Recommandé (All)
Avant l'initiation du traitement : – à la découverte de la séropositivité – sinon sur le prélèvement disponible le plus ancien – ou avant de débiter le traitement	Recommandé (All)
Échecs thérapeutiques	Recommandé (AI)
Prophylaxie post-exposition	À réaliser au cas par cas
Enfants	Mêmes indications que chez l'adulte (All)
Grossesse	Recommandé (All)

ÉTUDES EN COURS

Résistance et exposition aux antirétroviraux : les quotients inhibiteurs

L'un des objectifs actuels est d'intégrer les résultats des tests de résistance à ceux des dosages des concentrations plasmatiques en utilisant le quotient inhibiteur (QI), concept de relation pharmacocinétique-pharmacodynamique (PK-PD), qui combine l'exposition pharmacocinétique à un antirétroviral et la sensibilité d'une souche à un antirétroviral pour un patient donné. Les études sur le QI n'ont d'intérêt aujourd'hui que pour la classe des IP parce qu'on peut moduler leur concentration plasmatique. Le QI a d'abord été défini par le ratio entre la concentration résiduelle de l'antirétroviral (IP) mesurée chez le patient et la CI_{50} ou la CI_{90} mesurée par un test phénotypique réel ou évaluée par un test virtuel.

Une approche similaire est maintenant utilisée pour le génotype en remplaçant la CI_{50} ou la CI_{90} par le nombre de mutations associées à la résistance à un IP, ce qui définit le quotient inhibiteur génotypique (QIG). Il est souvent plus prédictif de la réponse virologique que ne le sont le nombre de mutations ou les C_{min} considérées séparément.

L'utilisation en routine du QIG nécessiterait une standardisation de son expression, la détermination de valeurs cibles dans des populations définies de patients prétraités mais

observants, l'étude de la pondération éventuelle de certaines mutations, une validation prospective au sein d'études cliniques adaptées, ainsi que la détermination de la valeur maximale tolérable de C_{min} en termes de toxicité si l'on considère son intérêt dans le cadre d'intensification des traitements. Ainsi, l'expression du QIG du lopinavir peut considérablement varier selon l'expression du dénominateur [45, 46].

Résistance dans l'ADN VIH cellulaire

La diffusion des différentes molécules antivirales est variable selon les compartiments de l'organisme, ce qui peut induire la sélection de virus résistants différents de ceux détectés dans le plasma sanguin, notamment dans le LCR et dans les compartiments génitaux [47-49]. Plusieurs études ont également montré que les virus archivés dans les lymphocytes pouvaient être différents de ceux présents dans le plasma [50, 51]. L'analyse des populations virales dans les cellules mononucléées du sang circulant chez les patients ayant une charge virale plasmatique au-dessous de 50 copies/ml a montré une compartimentation des variants viraux dans les lymphocytes T CD4 naïfs, les lymphocytes T CD4 mémoires et les monocytes [52]. La présence de virus résistants dans les réservoirs cellulaires n'implique pas systématiquement leur ré-émergence sous la pression sélective des molécules antivirales [53]. Il n'a pas été démontré que l'analyse des virus résistants dans les cellules mononucléées circulantes apportait un bénéfice pour le choix des traitements de relais. La prescription de tests génotypiques de résistance sur l'ADN lymphocytaire est réservée à des situations particulières.

Résistance et populations virales minoritaires

Ce point est développé plus haut.

Points forts

- On observe globalement en France une augmentation de la prévalence des virus résistants chez les patients chroniquement infectés et non traités, une diminution de cette prévalence chez les patients actuellement traités et une stabilité au moment de la primo-infection.
- La prévention de la sélection de mutants résistants nécessite de maintenir une charge virale sous traitement au-dessous du seuil de détection de 50 copies/ml.
- Les tests génotypiques de résistance sont une aide importante à la décision du choix du traitement de relais. Ce choix peut nécessiter une concertation multidisciplinaire associant cliniciens, virologues et pharmacologues.
- L'algorithme d'interprétation des tests génotypiques de résistance évolue régulièrement. Il est nécessaire de consulter le site : <http://www.hivfrenchresistance.org> pour connaître les dernières mises à jour.
- La barrière génétique des inhibiteurs d'intégrase est faible, avec des résistances croisées entre les deux médicaments de la classe.
- L'expertise du virologue est majeure pour l'interprétation des algorithmes de résistance, en particulier dans le cas de résistances « possibles », dans les multi-échecs ou lorsque les données sont préliminaires.

Le groupe d'experts recommande :

- de réaliser un test génotypique de résistance lors du diagnostic de l'infection par le VIH (Alla), ou sur le dernier prélèvement disponible avant de débiter le traitement (Alla) ;

- de renouveler ce test avant l'initiation du traitement en cas de risque de surinfection (BIII) ;
- de réaliser les tests de résistance en cas d'échec virologique alors que le patient est sous traitement antirétroviral (Aa) ;
- de rendre le premier résultat du génotype de résistance accompagné de l'identification du sous-type de VIH-1 (AIIa) ;
- de réinterpréter les anciens résultats des tests génotypiques avec l'algorithme le plus récent (BIII) ;
- de réaliser un test de tropisme avant de prescrire un inhibiteur de co-récepteur CCR5 (Aa) ;
- de conduire des études de recherche clinique sur la prévalence et la signification des variants minoritaires.

BIBLIOGRAPHIE

1. HIRSH MS, BRUN-VÉZINET F, CLOTET B et al. Antiretroviral drug resistance testing in adults infected with human immunodeficiency virus type 1 : 2003 recommendations of an international AIDS Society-USA panel. *Clin Infect Dis*, 2003, 37 : 113-128.
2. HIRSH MS, GÜNTARD H, SCHAPIRO J et al. Antiretroviral drug resistance testing in adults infected with human immunodeficiency virus type 1 : 2008 recommendations of an international AIDS Society-USA panel. *Clin Infect Dis*, 2008, 47 : 266-285.
3. DE MENDOZA C JIMÉNEZ-NACHER I, GARRIDO C et al. Changing patterns in HIV reverse transcriptase resistance mutations after availability of ténofovir. *Clin Infect Dis*, 2008, 46 : 1782-1785.
4. NIKOLENKO GN, DELVIKS-FRANKENBERRY KA, PALMER S et al. Mutations in the connection domain of HIV-1 reverse transcriptase increase 3'-azido-3'-deoxythymidine resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104 : 317-322.
5. DELVIKS-FRANKENBERRY KA, NIKOLENKO GN, BARR R et al. Mutations in human immunodeficiency virus type 1 RNase H primer grip enhance 3'-azido-3'-deoxythymidine resistance. *J Virol*, 2007, 81 : 6837-6845.
6. MADRUGA JV, CAHN P, GRINSZTEJN B et al. Efficacy and safety of etravirine in treatment-experienced HIV-1-infected patients in DUET-1 : 24-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, 2007, 370 : 29-38.
7. VINGERHOETS J, BUELENS A, PEETERS M et al. Impact of baseline NNRTI mutations on the virological response to etravirine in the phase III clinical trials DUET-1 and DUET-2. *Antivir Ther*, 2007, 12 : S34.
8. DELFRAISSY JF, FLANDRE P, DELAUGERRE C et al. Lopinavir/ritonavir monotherapy or plus zidovudine and lamivudine in antiretroviral-naïve HIV-infected patients. *AIDS*, 2008, 22 : 385-393.
9. BAXTER JD, SCHAPIRO JM, BOUCHER CA et al. Genotypic changes in human immunodeficiency virus type 1 protease associated with reduced susceptibility and virologic response to the protease inhibitor tipranavir. *J Virol*, 2006, 80 : 10794-10801.
10. DE MEYER S, VANGENEUGDEN T, LEFEBVRE E et al. Phenotypic and genotypic determinants of resistance to TMC114 : pooled analysis of POWER 1, 2, and 3. *Antivir Ther*, 2006, 11 : S83.
11. MITSUYA Y, LIU TF, RHEE SY et al. Prevalence of darunavir resistance-associated mutations : patterns of occurrence and association with past treatment. *J Infect Dis*, 2007, 196 : 1177-1179.
12. NIJHUIS M, VAN MAARSEVEEN NM, LASTERE S et al. A novel substrate-based HIV-1 protease inhibitor drug resistance mechanism. *PLoS Med*, 2007, 4 : e36.
13. DORR P, WESTBY M, DOBBS S et al. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49 : 4721-4732.
14. KUHMANN SE, PUGACH P, KUNSTMAN KJ et al. Genetic and phenotypic analyses of human immunodeficiency virus type 1 escape from a small-molecule CCR5 inhibitor. *J Virol*, 2004, 78 : 2790-2807.

15. WESTBY M, SMITH-BURCHNELL C, MORI J et al. Reduced maximal inhibition in phenotypic susceptibility assays indicates that viral strains resistant to the CCR5 antagonist maraviroc utilize inhibitor-bound receptor for entry. *J Virol*, 2007, *81* : 2359-2371.
16. MORI J, MOSLEY M, LEWIS M et al. Characterization of maraviroc resistance in patients failing treatment with CCR5-tropic virus in MOTIVATE 1 and MOTIVATE 2. *Antivir Ther*, 2007, *12* : S12.
17. DELOBEL P, NUGEYRE MT, CAZABAT M et al. Population-based sequencing of the V3 region of env for predicting the coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 quasi species. *J Clin Microbiol*, 2007, *45* : 1572-1580.
18. SING T, LOW AJ, BEERENWINKEL N et al. Predicting HIV coreceptor usage on the basis of genetic and clinical covariates. *Antivir Ther*, 2007, *12* : 1097-1106.
19. SKRABAL K, LOW AJ, DONG W et al. Determining human immunodeficiency virus coreceptor use in a clinical setting : degree of correlation between two phenotypic assays and a bioinformatic model. *J Clin Microbiol*, 2007, *45* : 279-284.
20. HAZUDA DF, MILLER MD, NGUYEN BY et al. Resistance to the HIV-integrase inhibitor raltegravir : analysis of protocol 005, a phase II study in patients with triple-class resistant HIV-1 infection. *Antivir Ther*, 2007, *12* : S10.
21. SHIMURA K, KODAMA E, SAKAGAMI Y et al. Broad antiretroviral activity and resistance profile of the novel human immunodeficiency virus integrase inhibitor elvitegravir (JTK-303/GS-9137). *J Virol*, 2008, *82* : 764-774.
22. DESCAMPS D, DELAUGERRE C, MASQUELIER B et al. Repeated HIV-1 resistance genotyping external quality assessments improve virology laboratory performance. *J Med Virol*, 2006, *78* : 153-160.
23. BRUN-VÉZINET F, COSTAGLIOLA D, KHALED MA et al. Clinically validated genotype analysis : guiding principles and statistical concerns. *Antivir Ther*, 2004, *9* : 465-478.
24. JOHNSON VA, BRUN-VÉZINET F, CLOTET B et al. Update of the drug resistance mutations in HIV-1 : spring 2008. *Top HIV Med*, 2008, *16* : 62-68.
25. RAVELA J, BETTS BJ, BRUN-VÉZINET F et al. HIV-1 protease and reverse transcriptase mutation patterns responsible for discordances between genotypic drug resistance interpretation algorithms. *J AIDS*, 2003, *33* : 8-14.
26. SNOECK J, KANTOR R, SHAFER RW et al. Discordances between interpretation algorithms for genotypic resistance to protease and reverse transcriptase inhibitors of human immunodeficiency virus are subtype dependent. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, *50* : 694-701.
27. MARCELIN AG, MASQUELIER B, DESCAMPS D et al. Mutations associated with response to boosted tipranavir in HIV-1-infected PI-experienced patients [abstract 612]. 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, 2007, Boston (MA).
28. BRENNER BG, OLIVEIRA M, DOUALLA-BELL F et al. HIV-1 subtype C viruses rapidly develop K65R resistance to ténofovir in cell culture. *AIDS*, 2006, *20* : F9-F13.
29. DOUALLA-BELL F, AVALOS A, GAOLATHE T et al. Impact of human immunodeficiency virus type 1 subtype C on drug resistance mutations in patients from Botswana failing a nelfinavir containing regimen. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, *50* : 2210-2213.
30. ABECASIS AB, DEFORCHE K, SNOECK J et al. Protease mutation M89I/V is linked to therapy failure in patients infected with the HIV-1 non-B subtypes C, F or G. *AIDS*, 2005, *19* : 1799-1806.
31. AGHOKENG AF, EWANE L, AWAZI B et al. Enfuvirtide binding domain is highly conserved in non-B HIV type 1 strains from Cameroon, West Central Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2005, *21* : 430-433.
32. METZNER KJ, ALLERS K, RAUCH P, HARRER T. Rapid selection of drug-resistant HIV-1 during the first months of suppressive ART in treatment-naïve patients. *AIDS*, 2007, *21* : 703-711.
33. PALMER S, BOLTZ V, MALDARELLI F et al. Selection and persistence of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-resistant HIV-1 in patients starting and stopping non-nucleoside therapy. *AIDS*, 2006, *20* : 701-710.
34. METZNER KJ, RAUCH P, WALTER H et al. Detection of minor populations of drug-resistant HIV-1 in acute seroconverters. *AIDS*, 2005, *19* : 1819-1825.
35. KEARNEY M, PALMER S, MALDARELLI F et al. Frequent polymorphism at drug resistance sites in HIV-1 protease and reverse transcriptase. *AIDS*, 2008, *22* : 497-501.
36. JOHNSON J, LI JF, WEI X et al. Low-frequency mutations substantially increase the prevalence of transmitted drug resistance and greatly strengthen the relationship between resistance mutations and virological failure. 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections [abstract 639]. Los Angeles (CA), 2007.
37. METZNER KJ, RAUCH P, VON WYL V et al. Prevalence of minority quasispecies of drug-resistant HIV-1 in patients with primary HIV-1 infection in Zurich in the years 2002-2006. *Antivir Ther*, 2007, *12* : S47.

38. LIÈVRE L, DEVEAU C, GERBE J et al. Yearly number of patients diagnosed with primary HIV-1 infection in France estimated by a capture-recapture approach. *AIDS*, 2006, *20* : 2392-2395.
39. SHAFER RW, RHEE SY, PILLAY D et al. HIV-1 protease and reverse transcriptase mutations for drug resistance surveillance. *AIDS*, 2007, *21* : 215-223.
40. CHAIX ML, FICHOU J, DEVEAU C et al. Stable frequency of HIV-1 transmitted drug resistance over a decade (1996-2006) in France is likely explained by the increase of chronically treated patients in virological success. *Antivir Ther*, 2007, *12* : S49.
41. CHAIX ML, DESCAMPS D, HARZIC M et al. Stable prevalence of genotypic drug resistance mutations but increase in non-B virus among patients with primary HIV-1 infection in France. *AIDS*, 2003, *17* : 2635-2643.
42. LIMA V, HUDSON E, WYNHOVEN B et al. Drastically declining incidence of HIV resistance : the end of the beginning ? [abstract 895]. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, 2008, Boston (MA).
43. DESCAMPS D, CALVEZ V, IZOPET J et al. Prevalence of resistance mutations in antiretroviral-naïve chronically HIV-infected patients in 1998 : a French nationwide study. *AIDS*, 2001, *15* : 1777-1782.
44. DESCAMPS D, CHAIX ML, ANDRÉ P et al. French national sentinel survey of antiretroviral drug resistance in patients with HIV-1 primary infection and in antiretroviral-naïve chronically infected patients in 2001-2002. *J AIDS*, 2005, *38* : 545-552.
45. VON WYL V, YERLY S, BONI J et al. The proportion of individuals without further treatment options has stabilized at a low levels in the Swiss HIV Cohort Study [abstract 896]. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, 2008, Boston (MA).
46. COSTAGLIOLA D, DESCAMPS D, ASSOUMOU L et al. Prevalence of HIV-1 drug resistance in treated patients : a French nationwide study. *J AIDS*, 2007, *46* : 12-18.
47. GIANOTTI N, GALLI L, DANISE A et al. Ability of different lopinavir genotypic inhibitory quotients to predict 48-week virological response in highly treatment-experienced HIV-infected patients receiving lopinavir/ritonavir. *J Med Virol*, 2006, *78* : 1537-1541.
48. TORTI C, UCCELLI MC, QUIROS-ROLDAN E et al. Prediction of early and confirmed virological response by genotypic inhibitory quotients for lopinavir in patients naïve for lopinavir with limited exposure to previous protease inhibitors. *J Clin Virol*, 2006, *35* : 414-419.
49. KEMAL KS, FOLEY B, BURGER H et al. HIV-1 in genital tract and plasma of women : compartmentalization of viral sequences, coreceptor usage, and glycosylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, *100* : 12972-12977.
50. OHAGEN A, DEVITT A, KUNSTMAN KJ et al. Genetic and functional analysis of full-length human immunodeficiency virus type 1 env genes derived from brain and blood of patients with AIDS. *J Virol*, 2003, *77* : 12336-12345.
51. DELWART EL, MULLINS JI, GUPTA P et al. Human immunodeficiency virus type 1 populations in blood and semen. *J Virol*, 1998, *72* : 617-623.
52. FULCHER JA, HWANGBO Y, ZIONI R et al. Compartmentalization of human immunodeficiency virus type 1 between blood monocytes and CD4+ T cells during infection. *J Virol*, 2004, *78* : 7883-7893.
53. GHOSH J, PELLEGRIN I, GOJJARD C et al. HIV-1 resistant strains acquired at the time of primary infection massively fuel the cellular reservoir and persist for lengthy periods of time. *AIDS*, 2006, *20* : 159-170.
54. DELOBEL P, SANDRES-SAUNÉ K, CAZABAT M et al. Persistence of distinct HIV-1 populations in blood monocytes and naïve and memory CD4 T cells during prolonged suppressive HAART. *AIDS*, 2005, *19* : 1739-1750.
55. SILICIANO JD, SILICIANO RF. A long-term latent reservoir for HIV-1 : discovery and clinical implications. *J Antimicrob Chemother*, 2004, *54* : 6-9.