



Résistance aux ARV en Tunisie:

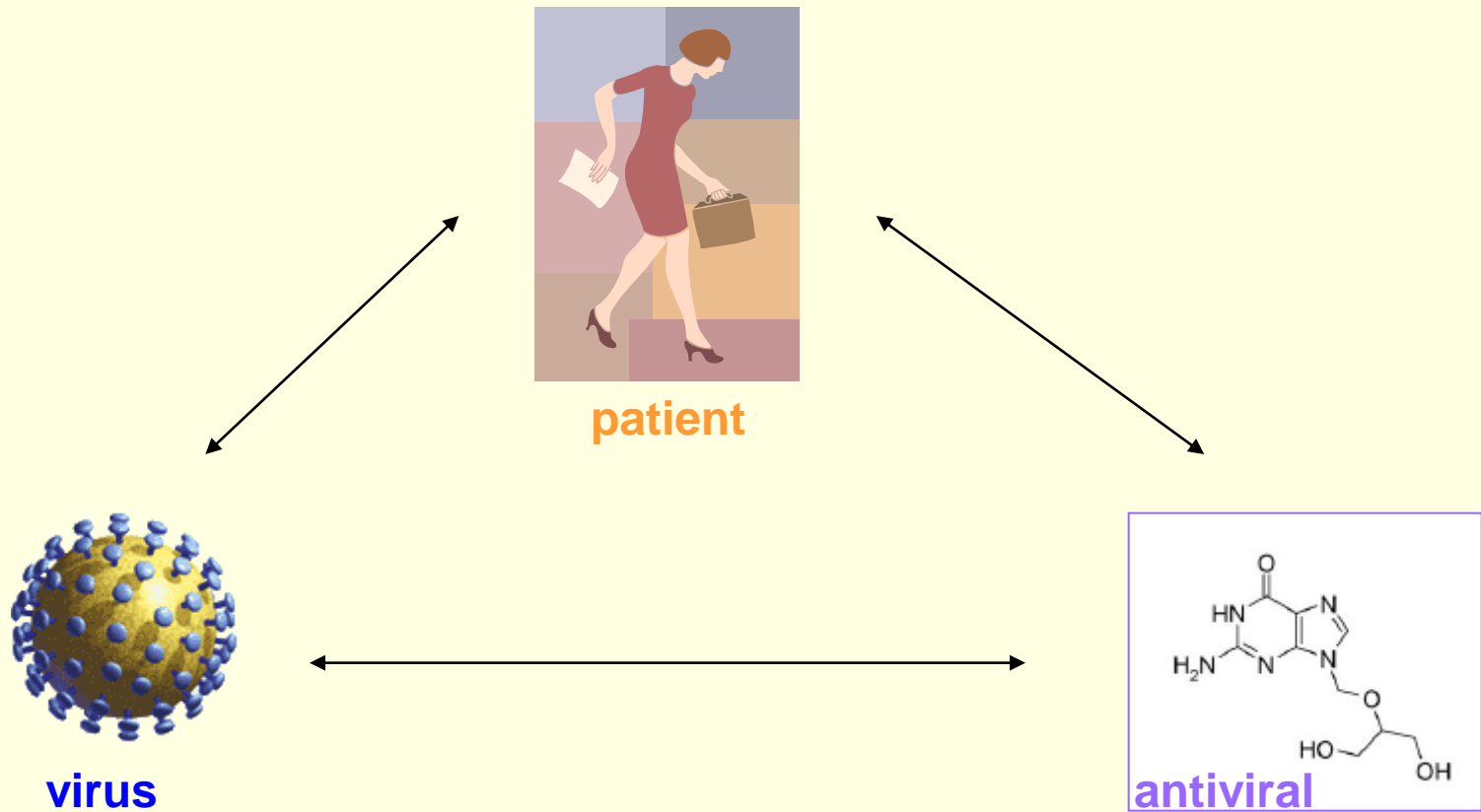
Résistons-nous au VIH?

Amine Slim

Unité de Virologie

EPS Charles Nicolle Tunis

Réponse clinique aux antiviraux



Sous-Types Epidémiologiques

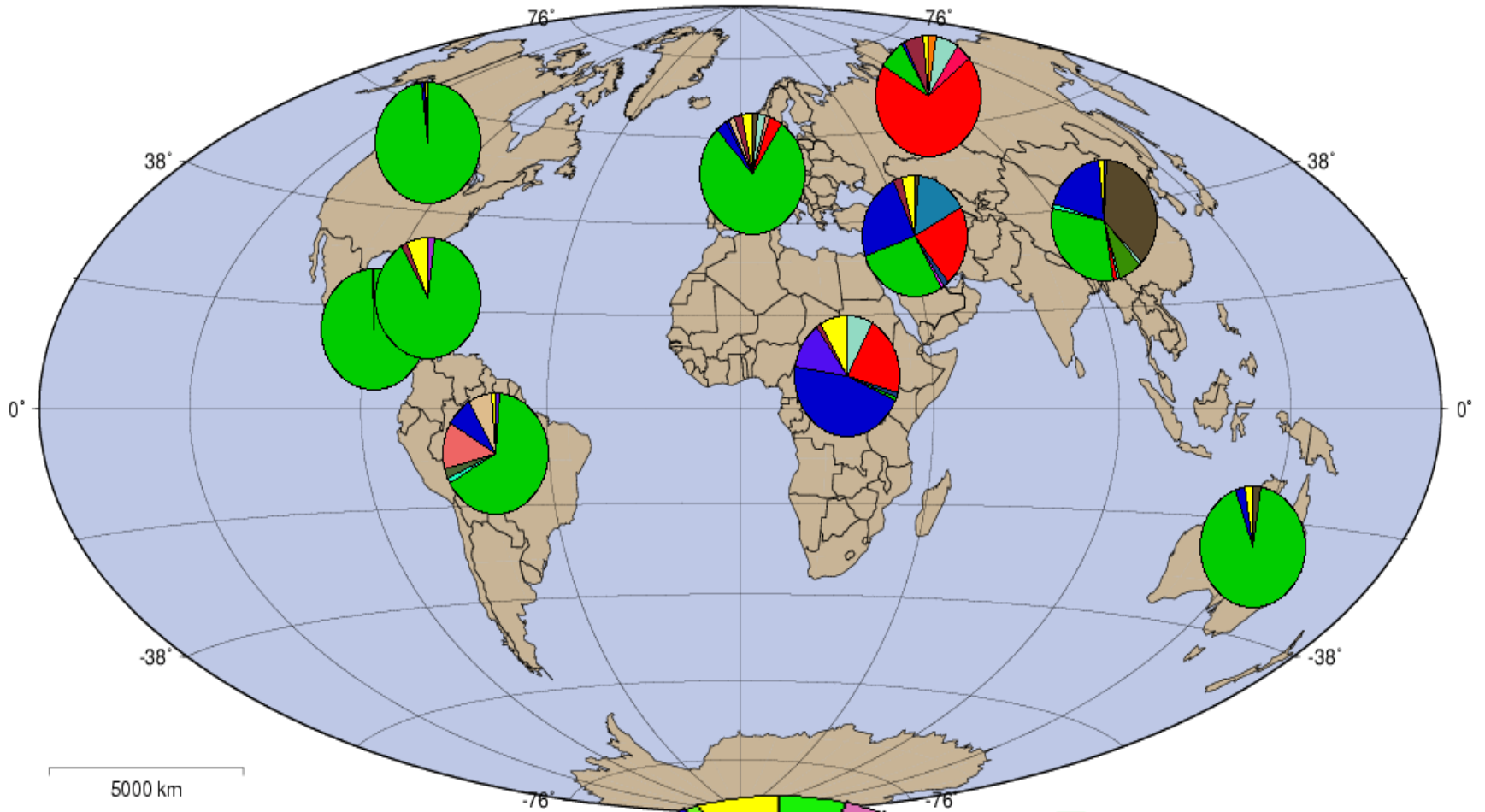
- **Classification basée sur le séquençage de la boucle V3 (Glycoprotéine d'enveloppe)**
- **1998: 3 groupes de VIH-1 → M , O , N**
- **Groupe M: au moins 8 sous-types → A,B,C,D,F,G,H,J et 2 recombinants E et I**
- **Nouveau recombinant (P) détecté chez le gorille: chaînon manquant?**
- **Intérêt: Epidémio → circulation des sous-types**
- **Transmission → parentérale: B → sexe: autres**
- **Résistance thérapeutique: ???**

Données Tunisiennes avant 2009

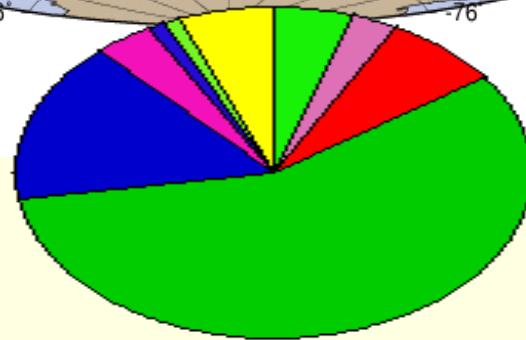
- Etude par séquençage de 24 souches de VIH-1 (Ben Halima, Slim, 1999): 23 sont de sous-type B, 1 sous-type A/C
- Etude par séro-typage de 20 cas à Sfax (Karray, 2002) → 18 Tunisiens (B)
→ 2 Lybiens (B, C)

Données de Génomique: 2009

- 63 souches Génomées par séquençage
- 55 génotype B
- 5 CRF-02 : recombinant A-G (8%)
- 2 double recombinants
- 1 génotype D
- Le génotype A-G se transmet sexuellement et va augmenter de façon significative les prochaines années +++
- Est-il déjà résistant en Tunisie?

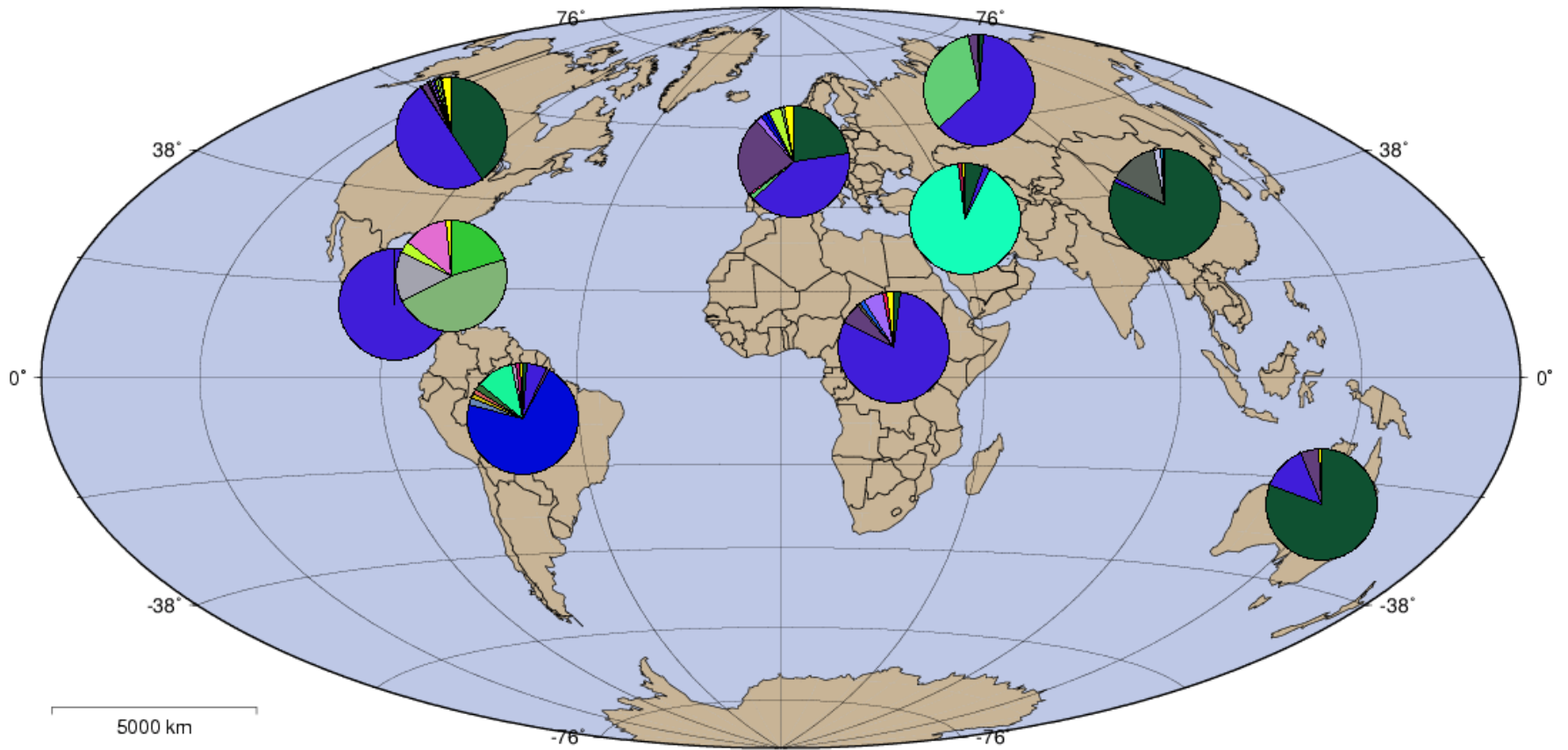


GMT 2003 Mar 11 09:23:31 | GMT 1.2

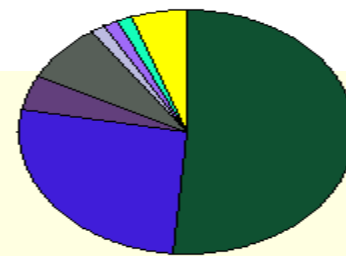


01_AE	24025	4.9 %
02_AF	14081	2.9 %
A	36926	7.5 %
B	281399	57.2 %
C	77321	15.7 %
D	18644	3.8 %
F	1573	0.3 %
G	5454	1.1 %
other	29142	5.9 %
-----		-----
total	491565	100.0 %

WORLD



GMT 2003 Mar 11 09:23:31 igmr 1.2

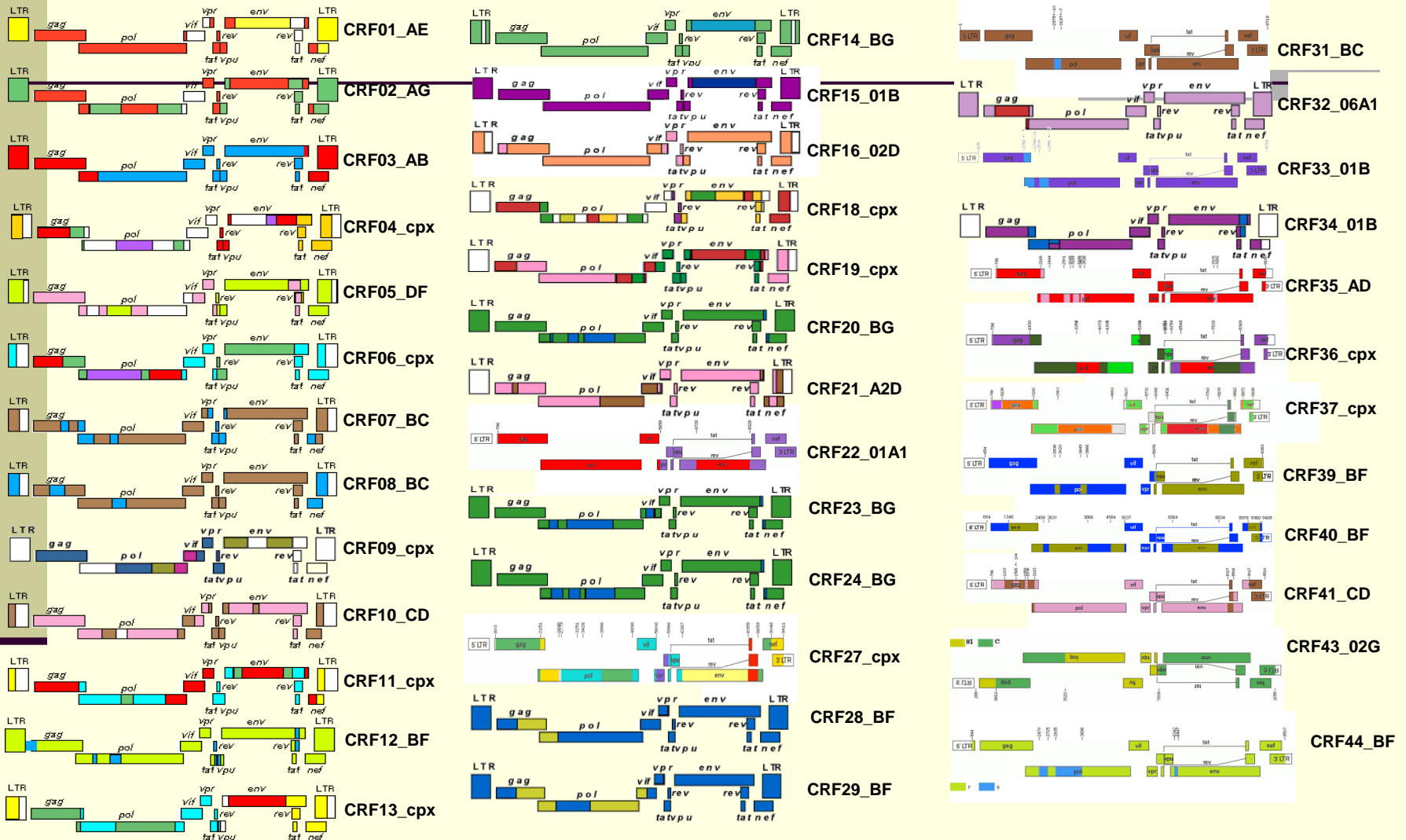


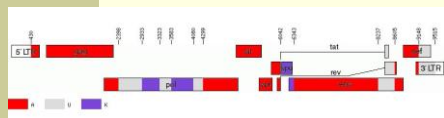
01_AE	28453	51.3 %
02_AG	14826	26.7 %
03_AF	3155	5.6 %
07_BC	4410	7.9 %
08_BC	709	1.3 %
11_cpx	920	1.7 %
35_AD	725	1.3 %
other	2992	5.4 %

total	55490	100.0 %

WORLD

Formes Recombinantes Circulantes du VIH-1

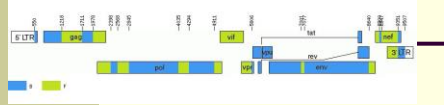




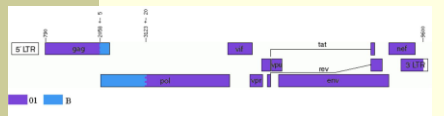
CRF45_cpx



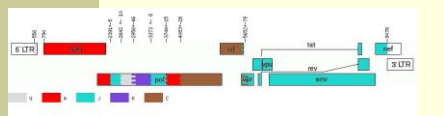
CRF46_BF



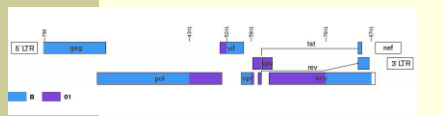
CRF47_BF



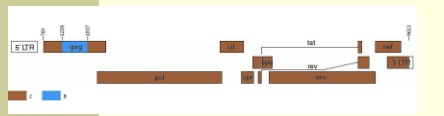
CRF48_01BF



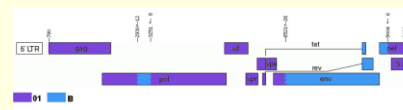
CRF49_cpx



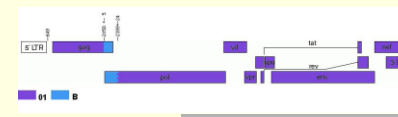
CRF51_01B



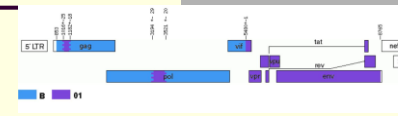
CRF57_BC



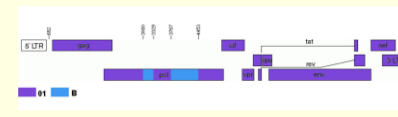
CRF52_01B



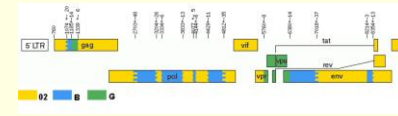
CRF53_01B



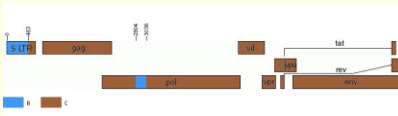
CRF54_01B



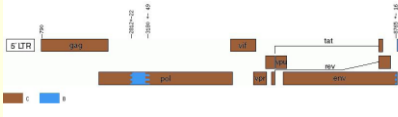
CRF55_01B



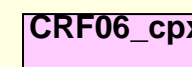
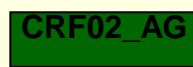
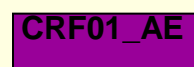
CRF56_cpx



CRF60_BC

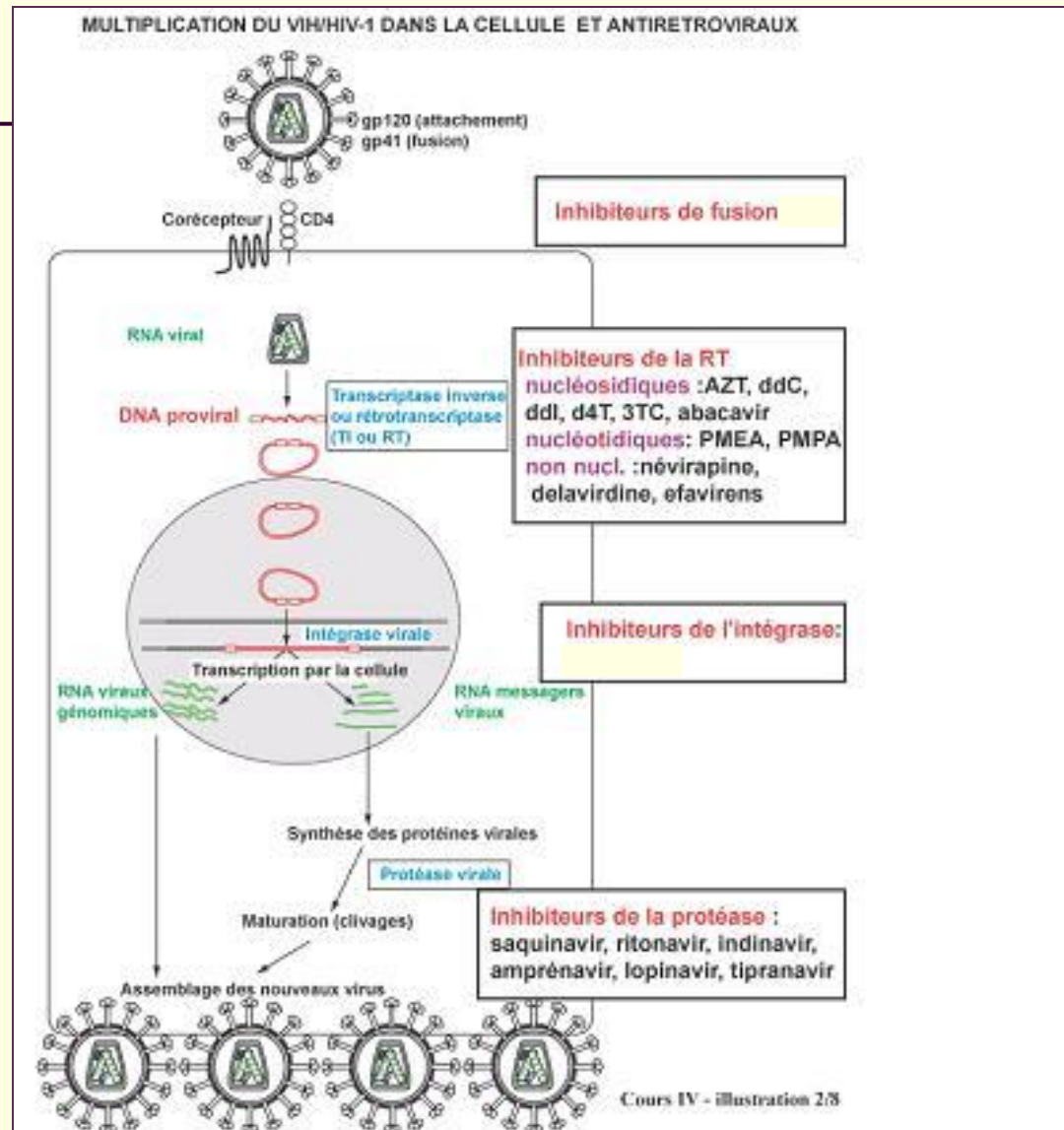


CRF61_BC



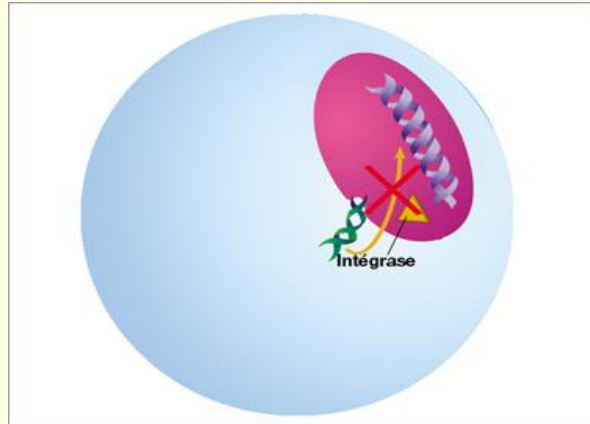
Génotype VIH	B	Recombinants
2002	41 (94%)	3 (7%) A-C , B-C
2009	55 (87%)	8 (13%) dont 5 CRF02-AG (8%)
2015	39 (35%)	75 (65%) dont 33 CRF02-AG ((29%) et 10 URF

CLASSES DES ANTIRÉTROVIRAUX



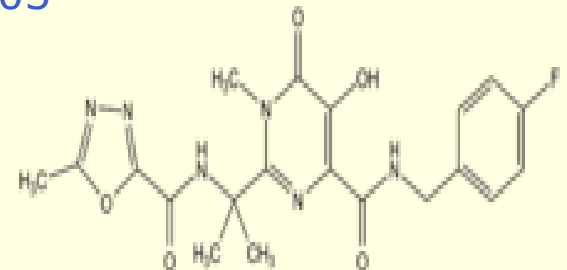
INHIBITEURS DE L'INTEGRASE

Ces inhibiteurs bloquent l'action de l'intégrase et empêchent le génome viral de se lier à celui de la cellule cible



Raltégravir (ISENSTRESS, MK 0518) : 2003

- Inhibiteur de l'intégrase
- Il est indiqué chez l'adulte en échappement thérapeutique ou si intolérance aux autres ARV
- Posologie : 400 mg x2/j P.O
- EI : Diarrhée, vomissements, céphalée



RESISTANCES AUX ANTI-RETROVIRAUX

Dés 1989, des mutants résistants à l'AZT étaient sélectionnés chez les patients traités; ce phénomène de résistance a été confirmé pour les différentes classes de molécules anti-rétrovirales

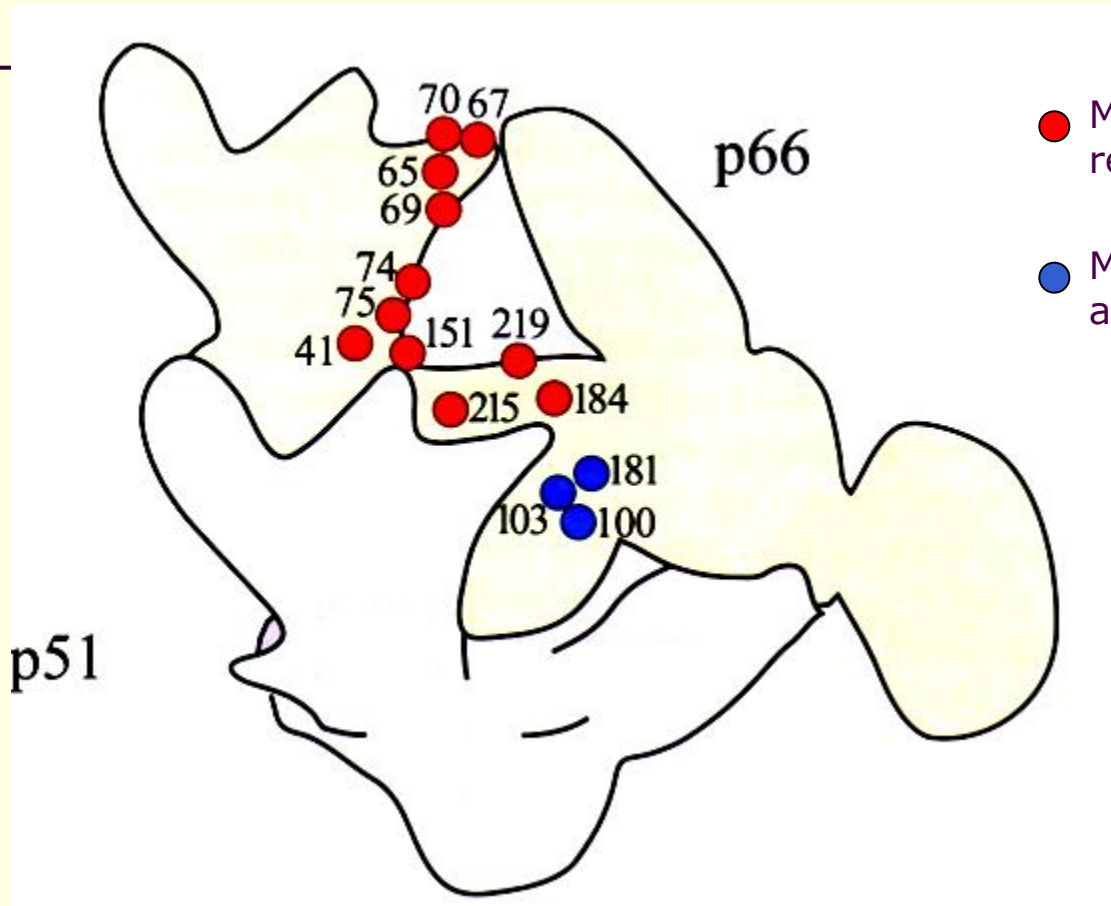
Ces résistances sont dues à la diversité génétique liée aux erreurs effectuées par la TI (1 erreur pour 10000 bases par cycle de réplication) et à la réplication virale très dynamique (10 milliard de nouveaux virus /jour) et principalement en présence de concentration sous optimale d'anti-rétroviraux.

on estime aussi que toute la population virale plasmatique est renouvelée toutes les 6 heures lors d'un Ttt ARV ! (d'où sélection rapide de mutants résistants en monothérapie !)

Facteurs de risque:

- Monothérapie
- Posologie inadaptée
- Mauvaise observance du traitement
- Arrêt du traitement

RESISTANCES AUX ANTI-RETROVIRAUX



- Mutations de résistance aux INTI
- Mutations de résistance aux INNTI

Localisation schématique des mutations de résistance aux inhibiteurs de la transcriptase inverse

Lecture des résistances: selon les codons mutés

- **A**: Alanine **C**: Cystéine **D**: Aspartate **E**: glutamate **F**: Phényl-alanine
- **G**:Glycine **H**: Histidine **I**: Isoleucine **K**: Lysine **L**: Leucine **M**:Méthionine
- **N**: Asparagine **P**: Proline **Q**: Glutamine **R**: Arginine **S**: Sérine
- **T**: Thréonine **V**: Valine **W**: Tryptophane **Y**: Tyrosine

- Principaux codons mutés au niveau du gène de la RT:

→ 41, **69**, 70, 74, 75, **103**, 106, 151, 181, **184**, **215**

- Principaux codons mutés au niveau du gène de la protéase:

→ 30, 46, **48**, 50, 54, **82**, 84, 90

Ex: Ritonavir: la V82A multiplie la CI par 2, la V32I par 40 !

Saquinavir: la G48V multiplie la CI par 10

G48V + I84V + L90M multiplie par 30

G48V + I84V + L90M +L101R multiplie par 100 !

Profils de résistance 2002-2006

- Génotypes de résistance: 23 malades (F.Zouiten,2004)
- 57% présentent un profil muté: codon 82 (34%) codon 46 (26%) , codon 90 (13%) codon 48 (7%)
- Accumulation de mutations si pas de changement thérapeutique: 30 malades (A.Jlizi, 2008)

Traitement	Mutations	Pvt 1	PV2
INRT (30)	M41V M184V T215A	2(7%) 12(40%) 7(23%)	7(23%) 22(73%) 12(40%)
INNRT (11)	K103N	8(73%)	11(100%)
IP (19)	M46I V82A	2(10%) 5(26%)	7(37%) 8(42%)

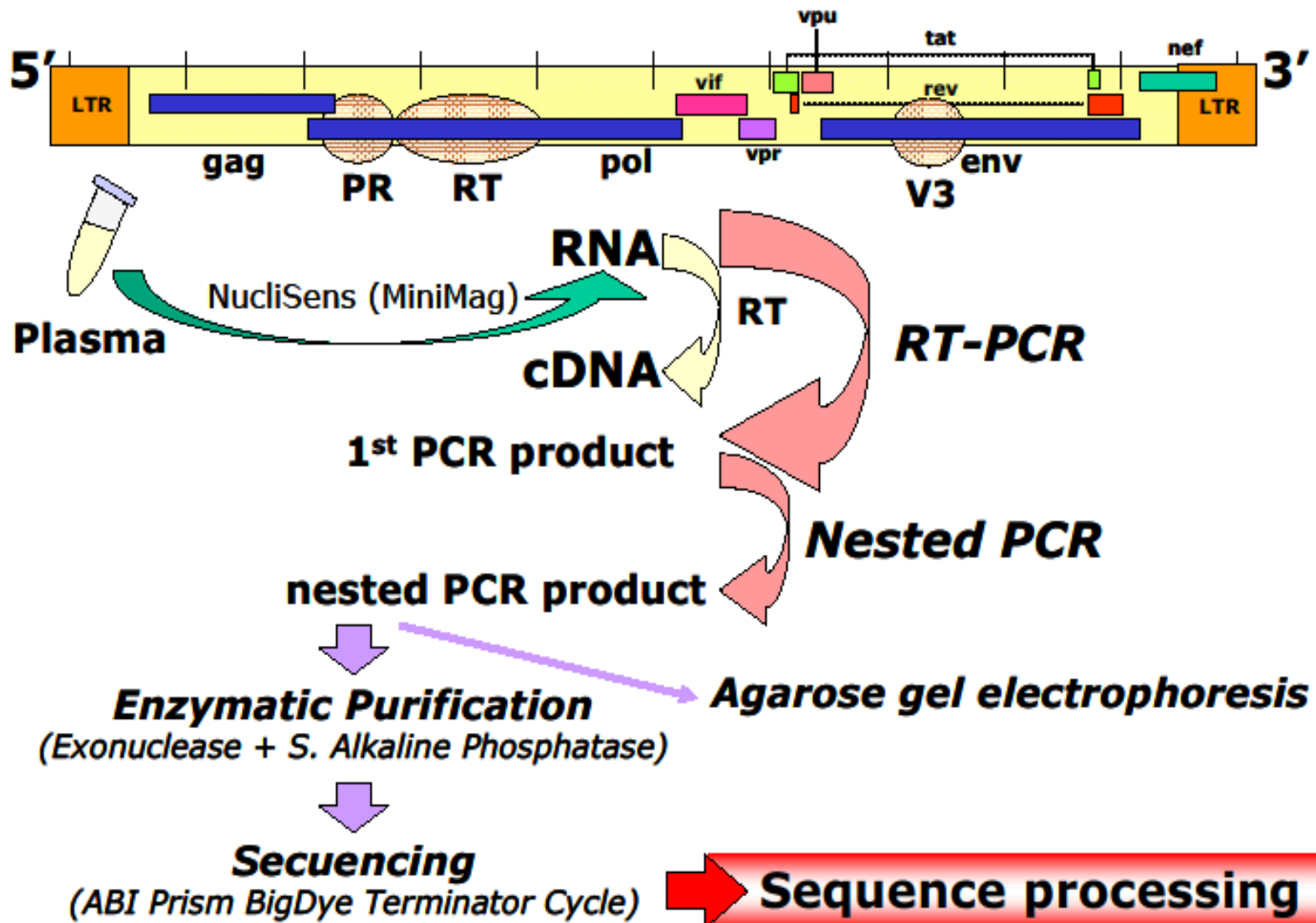
Analyse des profils de séquences 2010

- 63 séquences interprétables:

Résistance	B	CRF02-AG	D	B/CRF02-AG	D-B
Sensible 20/63 (32%)	16	3	1		
Intermédiaire 33/63 (52%)	30	1		1	1
Résistant 10/63 (16%)	9	1			

Résistance	Pourcentage
INRT seul	2/63 (3,2 %)
INNRT seul	4/63 (6,4%)
IP seul	1/63 (1,5%)
INRT+INNRT	17/63 (26,9%)
INRT+IP	9/63 (14%)

Sample processing



Sequence processing

Assemble:  *SeqMan*

Edit & Align:  *BioEdit*

ClustalX

MAFFT



Analysis

ARV resistance mutations:

 **STANFORD UNIVERSITY
HIV DRUG RESISTANCE DATABASE**
A curated public database designed to represent, store, and analyze the divergent

Intersubtype recombination:



RIP
Online: REGA
Genotyping



Quality Control

Local BLAST:  *BioEdit*

Phylogenetic tree: *MEGA*

Links:

 **STANFORD UNIVERSITY
HIV DRUG RESISTANCE DATABASE**
A curated public database designed to represent, store, and analyze the divergent



ID	Hopital	Date Prelevement	Stade
1	4548	Rabta Tunis	19/04/2014
2	6703	Pneumo CHU	09/06/2014
3	6656	Rabta Tunis	07/06/2014
4	6629	Rabta Tunis	07/06/2014
5	9584	Rabta Tunis	30/08/2014
6	6299	Rabta Tunis	31/05/2014
7	6031	Rabta Tunis	24/05/2014
8	5066	Rabta Tunis	03/05/2014
9	7101	Rabta Tunis	21/05/2014
10	6881	Rabta Tunis	14/05/2014
11	7622	Rabta Tunis	05/07/2014
12	7619	Rabta Tunis	05/07/2014
13	7359	Rabta Tunis	28/06/2014
14	7629	Rabta Tunis	05/07/2014
15	7786	CHU Monastr	10/07/2014
16	7905	Rabta Tunis	12/07/2014
17	8191	Rabta Tunis	19/07/2014
18	7106	Rabta Tunis	21/05/2014
19	8392	Rabta Tunis	26/07/2014
20	5762	Rabta Tunis	17/05/2014
21	6945	Labo privé Nao	17/05/2014
22	7254	Labo privé Barc	25/06/2014
23	21	Clinique Taoufi	02/01/2014
24	796	Dispensaire 9 /	23/01/2014
25	1368	Labo privé Feni	06/02/2014
26	7628	Rabta Tunis	05/07/2014
27	9029	Rabta Tunis	16/08/2014
28	7375	Rabta Tunis	28/06/2014
29	5415	Rabta Tunis	10/05/2014
30	7907	Rabta Tunis	12/07/2014
31	9872	Rabta Tunis	06/09/2014
32	10393	Rabta Tunis	20/09/2014
33	10403	Rabta Tunis	20/09/2014
34	1181	Rabta Tunis	01/02/2014
35	1272	CHU Monastr	03/02/2014
36	1502	Rabta Tunis	08/02/2014
37	889	Rabta Tunis	25/01/2014
38	10395	Rabta Tunis	20/09/2014
39	11643	Rabta Tunis	18/10/2014
40	12296	Rabta Tunis	01/11/2014
41	12297	Rabta Tunis	01/11/2014
42	12605	Rabta Tunis	08/11/2014
43	4100	Rabta Tunis	08/04/2014
44	4545	Rabta Tunis	19/04/2014
45	6638	Rabta Tunis	07/06/2014
46	6307	Rabta Tunis	31/05/2014
47	3921	Rabta Tunis	05/04/2014
48	6037	Rabta Tunis	24/05/2014
49	5419	Rabta Tunis	10/05/2014
50	7370	Rabta Tunis	28/06/2014
51	6654	Rabta Tunis	07/06/2014
52	7365	Rabta Tunis	28/06/2014
53	7624	Rabta Tunis	05/07/2014
54	7630	Rabta Tunis	05/07/2014
55	7627	Rabta Tunis	05/07/2014

56	7908	Rabta Tunis	12/07/2014
57	7360	Rabta Tunis	28/06/2014
58	7898	Rabta Tunis	12/07/2014
59	6946	Labo privé Nao	17/06/2014
60	241	CHU Marsa	09/01/2014
61	8898	Rabta Tunis	09/08/2014
62	4637	Labo privé Fatn	22/04/2014
63	1701	CHU Farhat Ha	12/02/2014
64	9310	Rabta Tunis	23/08/2014
65	10108	Rabta Tunis	13/09/2014
66	10396	Rabta Tunis	20/09/2014
67	10767	Rabta Tunis	27/09/2014
68	1186	Rabta Tunis	01/02/2014
69	1491	Rabta Tunis	07/02/2014
70	1660	CHU Hedi Chal	12/02/2014
71	9869	Rabta Tunis	06/09/2014
72	11642	Rabta Tunis	18/10/2014
73	11745	CHU Monastr	21/10/2014
74	12494	CHU Hedi Chal	06/11/2014
75	12610	Rabta Tunis	08/11/2014
76	13313	Rabta Tunis	24/11/2014
77	13309	Rabta Tunis	25/11/2014
78	11141	CHU Farhat Ha	08/10/2014
79	11246	CHU Farhat Ha	10/10/2014
80	12946	Rabta Tunis	15/11/2014
81	12956	Rabta Tunis	15/11/2014
82	11630	Rabta Tunis	18/10/2014
83	12295	Rabta Tunis	01/11/2014
84	12954	Rabta Tunis	15/11/2014
85	14242	Rabta Tunis	13/12/2014
86	14559	Rabta Tunis	20/12/2014
87	14566	Rabta Tunis	20/12/2014
88	14569	Rabta Tunis	20/12/2014
89	14889	Rabta Tunis	27/12/2014
90	13941	Rabta Tunis	16/12/2014
91	14890	Rabta Tunis	27/12/2014
92	153	Rabta Tunis	07/01/2015
93	423	Rabta Tunis	12/01/2015
94	408	Rabta Tunis	10/01/2015
95	402	Rabta Tunis	10/01/2015
96	748	Rabta Tunis	17/01/2015
97	754	Rabta Tunis	17/01/2015
98	403	Rabta Tunis	10/01/2015
99	1544	Rabta Tunis	31/01/2015
100	1548	Rabta Tunis	31/01/2015
101	1538	Rabta Tunis	01/01/2015
102	1531	Rabta Tunis	31/01/2015
103	1532	Rabta Tunis	31/01/2015
104	1529	Rabta Tunis	31/01/2015
105	409	Rabta Tunis	10/01/2015
106	1890	Rabta Tunis	07/02/2015
107	1677	CHU Farhat Ha	04/02/2015
108	1662	CHU Monastr	04/02/2015
109	3393	Rabta Tunis	07/03/2015
110	1541	Rabta Tunis	31/01/2015
111	2809	Hopital Ariana	25/02/2015
112	3651	Hopital Militaire	12/03/2015
113	3843	Rabta Tunis	14/03/2015
114	3842	Rabta Tunis	14/03/2015

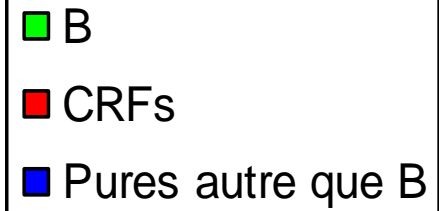
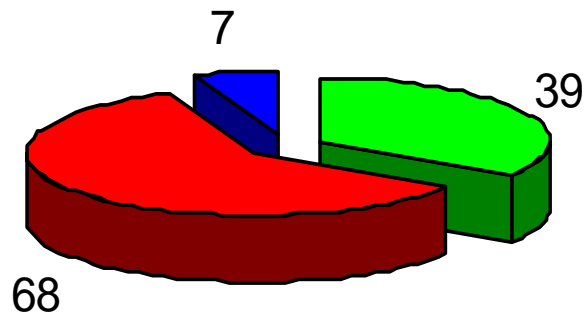
114 GENOTYPES

64 TRAITES

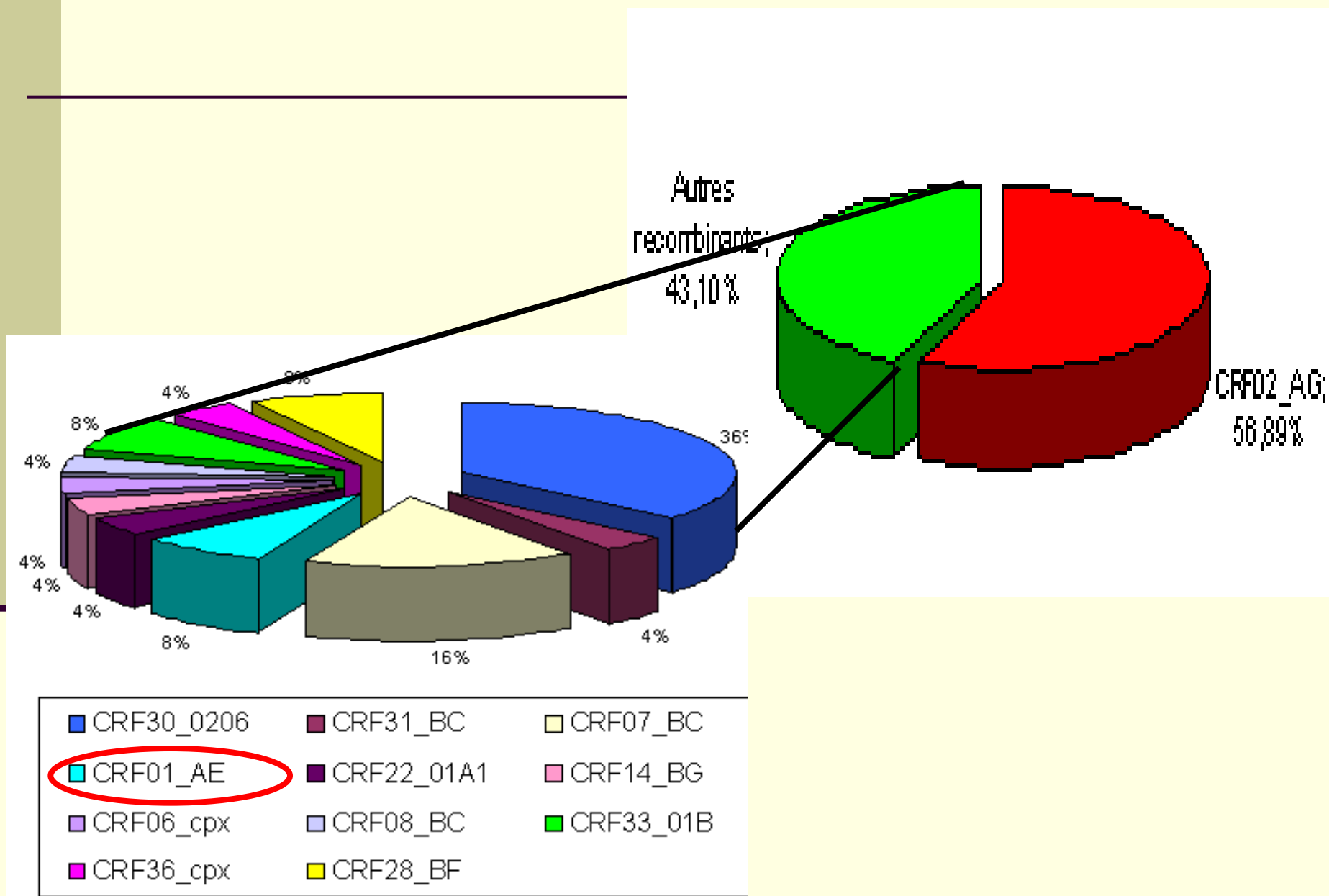
50 NAIFS

Nombre des génotypes du VIH-1 en Tunisie

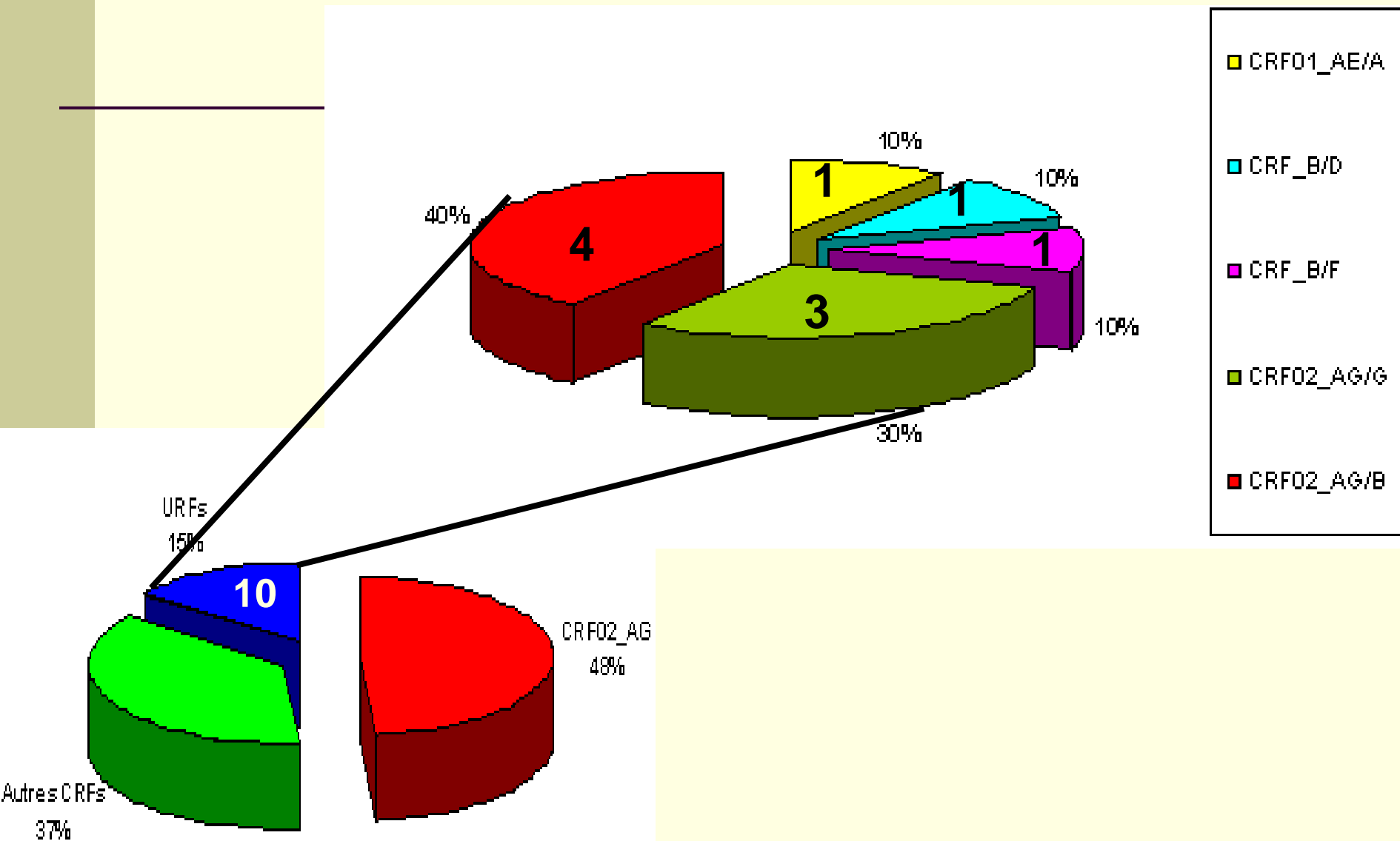
114 Génotypes



Distribution des FORMES RECOMBINANTES du VIH-1 en Tunisie en 2014-2015



Distribution des FORMES RECOMBINANTES Uniques du VIH-1 en Tunisie en 2014-2015



Pourcentage de la Résistance aux Anti-rétroviraux

Proportion of sequences with SDRMs

Resistance category	No. analyzed	No. containing SDRM	%
Sequences with any SDRM	114	44	38,6
PR Sequences with any PI SDRM	114	13	11,4
RT Sequences with any NRTI SDRM	114	34	29,8
RT Sequences with any NNRTI SDRM	114	31	27,2
RT Sequences with any NRTI + any NNRTI SDRM	114	21	18,4
PRRT Sequences with any NRTI + any NNRTI + PI SDRM	114	6	5,3

Total des
Patients
Analysés

Proportion of sequences with SDRMs

Resistance category	No. analyzed	No. containing SDRM	%
Sequences with any SDRM	64	42	65,6
PR Sequences with any PI SDRM	64	12	18,8
RT Sequences with any NRTI SDRM	64	33	51,6
RT Sequences with any NNRTI SDRM	64	30	46,9
RT Sequences with any NRTI + any NNRTI SDRM	64	21	32,8
PRRT Sequences with any NRTI + any NNRTI + PI SDRM	64	6	9,4

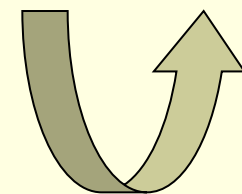
Patients
Traités
Analysés

Proportion of sequences with SDRMs

Resistance category	No. analyzed	No. containing SDRM	%
Sequences with any SDRM	46	3	6,5
PR Sequences with any PI SDRM	46	1	2,2
RT Sequences with any NRTI SDRM	46	2	4,3
RT Sequences with any NNRTI SDRM	46	2	4,3
RT Sequences with any NRTI + any NNRTI SDRM	46	1	2,2
PRRT Sequences with any NRTI + any NNRTI + PI SDRM	46	0	0

Patients

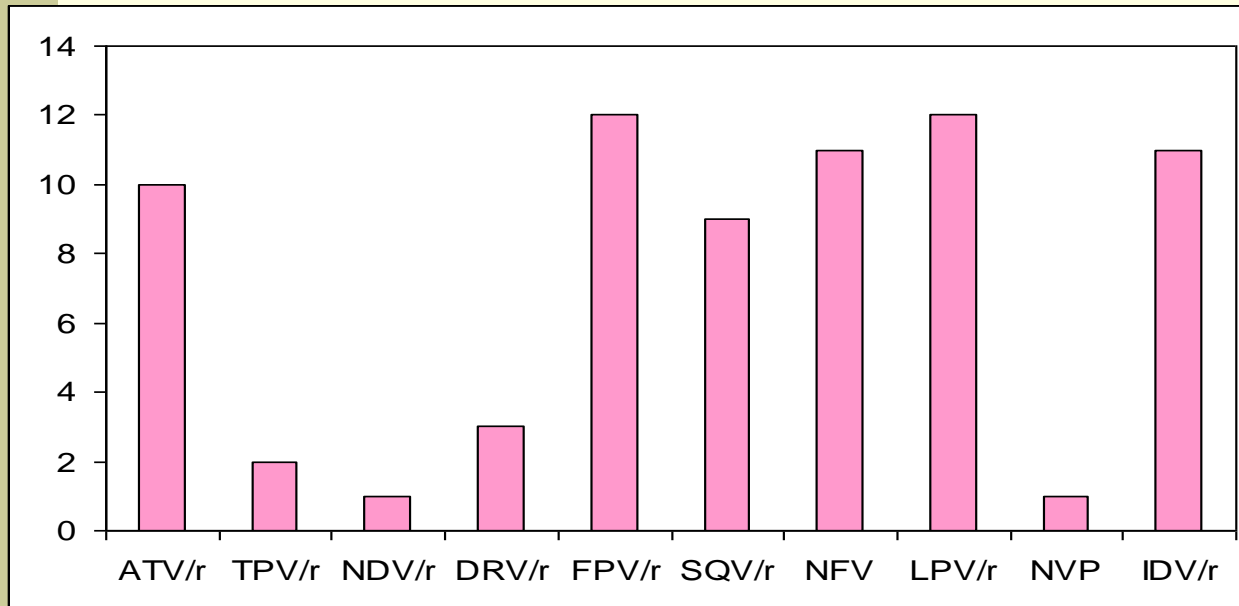
Naïfs
Analysés



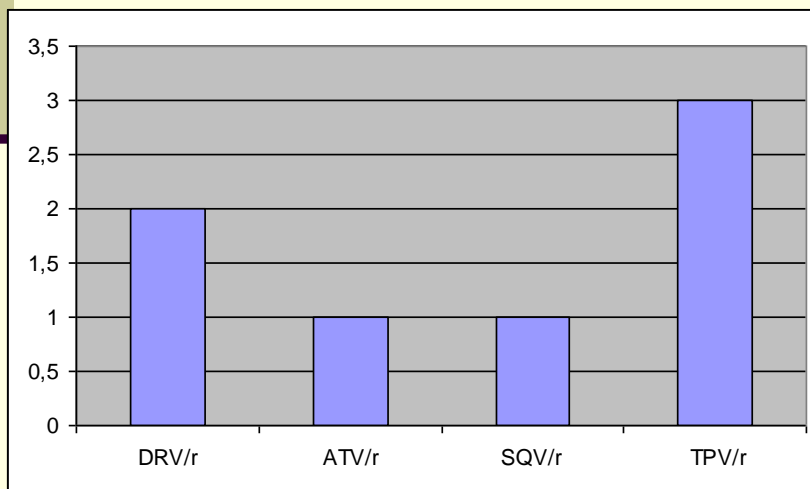
Sequences with SDRMs

SequenceID	NRTI SDRMs	NNRTI SDRMs	PI SDRMs
TN5415_PRT	D67G	K101E	None
TN4637_PRT	M184V	None	I47A
TN10767_PRT	None	K103N, P225H	None

Résistance aux molécules en % (2015)



**Haut Niveau
de
Résistance
IP**



**Résistance
Intermédiaire
IP**

Profil de Sensibilité

Nom :	C.	Service demandeur:	Infectieux
Prénom :	M.	Hôpital:	Monastir FBM
Age:		Date du prélèvement:	10/04/2009
Reference:	5064/09	✚ Charge Virale:	440000
Traitement:	AZT-3TC-IDV	Taux des CD4:	non indiqué
GENOTYPE: B			
RESISTANCES:			

Drug Class	Drug	Evidence of Resistance
NRTI	EPVIRB (abacavir, ABC)	None
	EMTRIVA (tenofovir, FTC)	None
	RETROVIR (zidovudine, AZT)	None
	VIKIRA (didanosine, ddI)	None
	ZERTIN (zalcitabine, dCT)	None
	ZIAGEN (abacavir, ABC)	None
	VIREAD (tenofovir, TDF)	None
NNRTI	RESCRIPTOR (efavirenz, EFV)	None
	SUSTIVA (efavirenz, EFV)	None
	VRAMUNE (nevirapine, NVP)	None
	INTELERGE (etravirine, ETR)	None
PI ⁺	AGENERASE (darunavir, DRV)	None
	LEKIVA (lopinavir, LPV)	None
	CRIVIAN (ritonavir, RTV)	None
	FORTOVA (atazanavir, ATV)	None
	KALETRA (lopinavir + ritonavir, LPV)	None
	PREZISTA (darunavir, DRV)	None
	VRACERT (nevirapine, NVP)	None
	REYATAZ (atazanavir, ATV)	None
	APTIVUS (tipranavir, TPV)	None

Double Génotype: Résistance double

Nom :	B.M.	Service demandeur:	Infectieux
Prénom :	A.	Hôpital:	Rabta
N° DOSSIER:	526/08	Date du prélèvement:	04/04/2009
Reference:	4785/09	Charge Virale:	26000
Traitement:	AZT-3TC-EFV	Taux des CD4:	48

GENOTYPE: D (en PR) B (en RT) à préciser par un 2ème Pvt.

RESISTANCES:

Drug Class	Drug	Evidence of Resistance
NRTI	EPIVIR® (lamivudine, 3TC)	Resistance*
	EMTRIVA® (emtricitabine, FTC)	Resistance*
	RETROVIR® (zidovudine, AZT)	Resistance***
	VIDEX® (didanosine, ddI)	Possible Resistance***
	ZERIT® (stavudine, d4T)	Resistance***
	ZIAGEN® (abacavir, ABC)	Possible Resistance***
	VIREAD® (tenofovir, TDF)	None
NNRTI	RESCRIPTOR® (delavirdine, DLV)	Resistance***
	SUSTIVA® (efavirenz, EFV)	Resistance***
	VIRAMUNE® (nevirapine, NVP)	Resistance***
	INTELENCE™ (etravirine, ETR)	None
PI [†]	AGENERASE® (amprenavir, APV)	None
	LEXIVA® (fosamprenavir, FOS)	None
	CRIVANE® (indinavir, IDV)	None
	FORTOVASE® / INIVIRASE® (saquinavir, SQV)	None
	KALETRA® (lopinavir + ritonavir, LPV)	None
	PREZISTA® (darunavir, DRV)	None
	VIRACEPT® (nelfinavir, NFV)	None
	REYATAZ® (atazanavir, ATV)	None
	APTIVUS® (tipranavir, TPV)	None

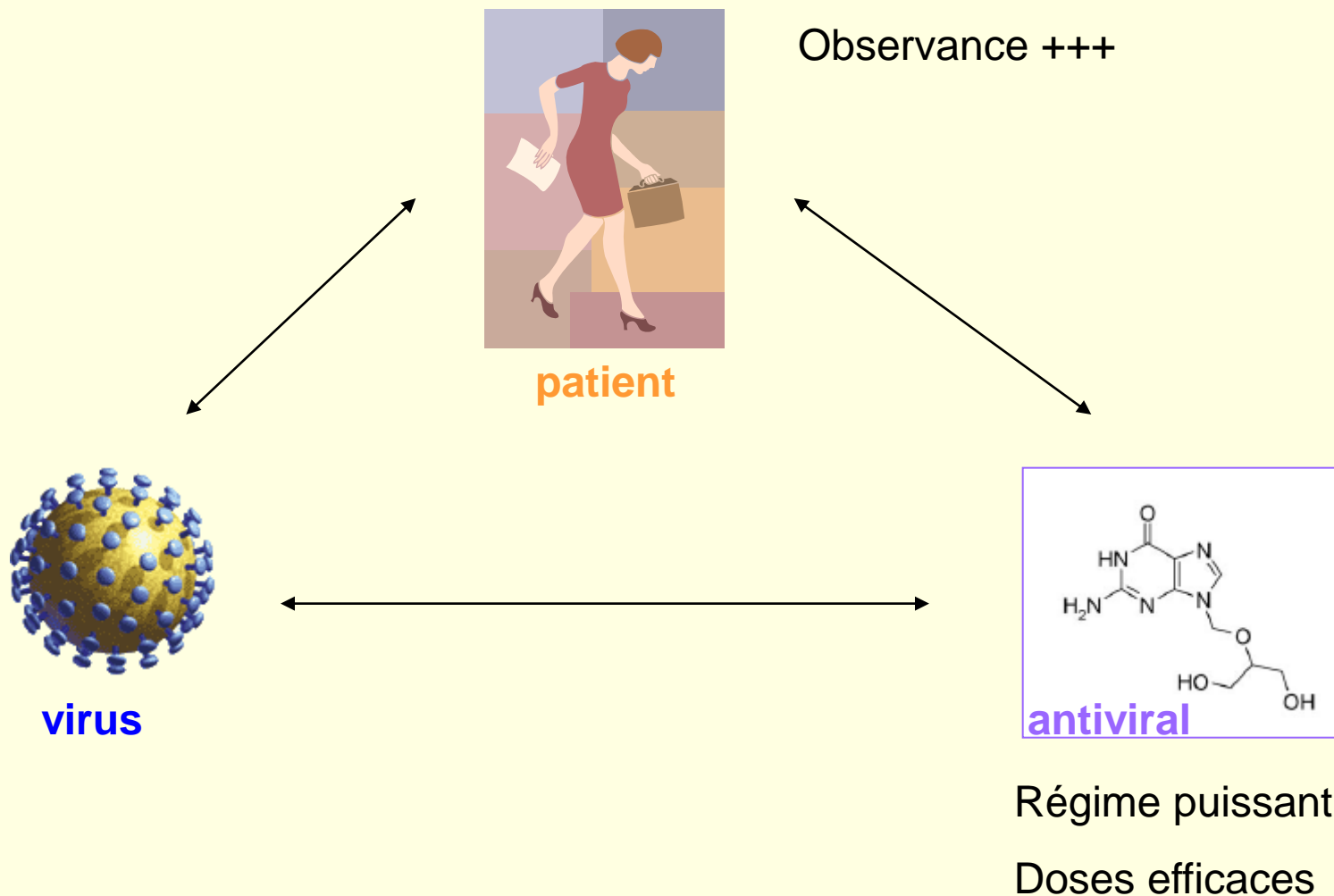
Points positifs du séquençage

- Permet le Génotypage
- Très précis pour les molécules utilisées
- Permet de choisir une thérapie alternative
- Résultats dans la semaine (si tout va bien!)
- Comparaison des séquences sur bases de données internationales
- Introduction du test pour les anti-intégrases si le budget le permet

Points négatifs du séquençage

- Technique longue sur 4 jours (mardi → vendredi)
- Nécessite un personnel spécialisé disponible
- Un taux de réussite variable: purification +++
- Appareil doit fonctionner en permanence
- Consommables très coûteux
- Pannes catastrophiques: arrêt prolongé

En pratique



Conclusions

- La recherche des résistances est impérative
- Mais aussi doit entrer dans un tout:
 - Profil clinico-biologique +
 - Discussion en staff des résultats ++
 - Observance du traitement ++
 - Disponibilité rapide des réactifs
 - Disponibilité des consommables
 - Disponibilité du personnel

Restons optimistes !!!!

Remerciements

- Unité de virologie HCN
- DSSB, ONFP, Global Found
- Services infectieux Tunisiens
- CHU Kremlin-Bicêtre
- Istituto Carlos III Sanidad Madrid
- ONUSIDA

