

UNIVERSITE DE BAMAKO

FACULTE DE MEDECINE DE PHARMACIE ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE

Année universitaire : 2003- 2004

Thèse N°

ETUDE DES EPITOPES-T IMMUNOGENES POUR LA MISE
AU POINT D'UN VACCIN ANTI-VIH-1

THESE

Présentée et soutenue publiquement le2004
devant la Faculté de Médecine, de Pharmacie et
d'Odontostomatologie

par **Melle Djénéba Koumba DABITAO**

Pour obtenir le grade de **DOCTEUR EN PHARMACIE**
(DIPLOME D'ETAT)

JURY

Président : Professeur Anatole TOUNKARA

Membre : Professeur Flabou BOUGOUDOGO

Professeur Abdel Kader TRAORE

Docteur Soukalo DAO

Directeur : Docteur Ousmane KOITA

*Les travaux ont été réalisés dans l'unité de virologie du LBMA avec le support de
GAIA fondation et du Département intramural du NIAID/NIH.*

DEDICACES
REMERCIEMENTS

DEDICACES :

♥ **A Allah** : Le Tout miséricordieux, le Très miséricordieux, toutes les louanges T'appartiennent. Tu m'as assisté tout au long de ma vie, je Te prie Seigneur d'accepter ce modeste travail en témoignage de ma reconnaissance et de ma foi.

Je Te demande, par Tes plus beaux noms et attributs de mettre de la sincérité dans ce travail et que Tu m'en fasses bénéficier dans ce monde et dans l'au-delà, ainsi qu'à ceux qui le liront, qui le publieront et qui le propageront. Et que ta bénédiction soit sur notre Prophète (psL), sur ces compagnons et sur tous ceux qui le suivent sur le bon chemin.

♥ **A mes parents : Mama Dabitaou, Safiatou Sangaré**

Plus que des parents vous êtes des amis. Vous m'avez donné une éducation exemplaire, vous m'avez appris la Crainte de Dieu en secret et en public, la Loyauté étant satisfaite ou en colère, la Modération dans la pauvreté et dans la richesse, la Satisfaction en matière de destinée et la Paix dans l'âme. Aujourd'hui ce résultat est le fruit de votre amour et de votre rigueur. Que Dieu vous donne longue vie afin de bénéficier du fruit de ce travail.

♥ **A mon cher et tendre époux : Adama Keita**

Tu es la providence de ma vie et la lanterne de mon avenir. Tu n'as ménagé aucun effort pour que j'arrive à ce niveau. Malgré la distance et les années, ton affection n'as jamais fait défaut, ta spontanéité et tes prières m'ont sans cesse accompagné et réconforté dans les moments les plus difficiles. Ce travail est le tien en témoignage de mon amour pour toi.

♥ **A ma sœur : Djénéba Dabitaou**

Ma chère complice, s'il y a une personne sur terre en qui je veux bien ressembler : c'est bien toi. Je profite de ce travail pour te réitérer mon admiration. Continue de faire régner la bonne humeur et l'harmonie dans la famille.

♥ **A mes frères : Abdoulaye, Nouhou, Kassim, Mohamed, Boubacar, Ousmane, Moussa**

Ce Travail est le fruit de votre soutien que Dieu fasse qu'il soit le perchoir de la solidarité et de l'entente dans la famille.

♥ **A la famille Keita**

Vous m'avez aimé, accueilli et soutenu. Je vous remercie vivement et vous prie d'accepter mes sentiments de profond respect.

♥ **A mon Grand-père : Kassim Dabitaou**

Tu m'as tant chouchoutée, j'espère rester digne de toi et que Dieu te garde aussi longtemps que possible au près de moi.

♥ **A mes Amies : Assa Sidibé, Badiè F Diarra**

Plus que des amies, vous êtes des sœurs pour moi. Tant de chemin parcouru depuis le lycée et nous sommes toujours là ensemble. Fasses le tout puissant raffermisse notre amitié.

♥ **A tous les malades du SIDA** : Surtout ne perdez pas la foie, Tant qu'il y a la vie il y a l'espoir.

REMERCIEMENTS :

♥ **A mes belles-sœurs :** Sogana, Charaf, merci sincèrement de votre soutien tout au long de ce travail.

♥ **A mes oncles et tantes :** Je vous remercie pour toutes les bénédictions que vous m'avez offert pendant mon parcours universitaire.

♥ **A mes cousins et cousines :** je dirai un grand merci pour les instants de fous rires qu'on a passés ensemble pour oublier le train-train quotidien.

♥ **A mes Aînés :** Dr Bagayoko dit Baga, Mahamadou Ibrah, plus que jamais je ne vous oublierai. Vous m'avez accueilli, supporté, considéré comme votre sœur ; après les moments difficiles voici un court instant de récréation.

♥ **A Dr Anne S. DeGroot** (Directrice du laboratoire VIH/TB de Brown University ; Directrice scientifique de la Fondation GAIA): J'ai été très honoré de travailler pour votre fondation et je vous remercie de la confiance que vous m'avez accordée en acceptant que je présente ce travail. Je souhaite pour vous plein succès et bonne continuation dans toutes vos entreprises.

♥ **A Dr Robert Gwardz** (Chef de Section entomologie du Laboratoire des Maladies Parasitaires du NIAID/NIH) et le **Pr Donald J. Krogstad** (Professeur Henderson et Chaire du Département de Médecine Tropicale, Tulane University School of Public Health and Tropical medicine, New Orleans, Louisiane) : Grâce à votre soutien, le LBMA a eu tous les équipements qu'ils fallait pour faire ce travail et pour respecter les normes internationales. Tout le personnel de notre laboratoire de part et d'autre vous remercie infiniment.

♥ **A Elizabeth Bishop et Julie McMurry :** Soyez rassurée vos conseils ont porté fruit. J'ai été fière d'être votre élève. Toute la rigueur de ce travail est de votre mérite.

♥ **A mes compagnons de tous les jours** : Alhassane Bada, Lassine Coulibaly Seydou Diakité, Fatoumata Alzhouma, Hamane Touré, Ousmane Maiga, Mathieu Ipou, Mamadou Cissoko, Dr Belco Maiga : Les mots me manquent pour vous remercier. Votre compagnie m'a accordé tout le dynamisme qu'il me fallait pour effectuer ce travail.

♥ **A mes camarades de promotion** : Ensemble, la route a été longue et souvent difficile, je souhaite pour vous tous bon succès sur cette nouvelle route.

♥ **A tous les internes du LBMA** : Merci pour votre assistance et surtout restez assidus et courageux. Ainsi va la vie !

♥ **A mes collègues du Projet GAIA Vaccine/MALI** : Dr Alzhouma, Dr Tall, Dr Guittèye, Dr Mousni. Ce Travail n'aurait pas eu lieu sans votre franche collaboration.

♥ **A mes collègues du Projet VIH/TB de la FMPOS** : Je vous souhaite bon courage pour ce nouveau défi que l'on doit gagner.

♥ **A tout le personnel du LBMA et du CNTS** : Merci pour votre courtoisie et surtout soyer unis pour le développement de vos services respectifs.

♥ **A mes maîtres** : Dr Kaourou Doucouré, Dr Samba Diop, Dr Thiéro
Merci pour l'aide que vous m'avez apporté pour la réalisation de ce travail.

♥ **A mes anciens encadreurs** : Grâce à vous j'ai atteint ce niveau, vous avez guidé mes premiers pas et aujourd'hui j'ai retrouvé le chemin vers le succès, merci infiniment.

♥ **A la LIEEMA** : Vous avez été ma seconde famille dans ma vie estudiantine.

A coté de vous j'étais rassuré, admirer et en paix avec moi-même. Vous avez dissipé le doute de mon cœur que Dieu vous bénisse.

♥ **A tous les Donneurs bénévoles de sang** : Merci beaucoup pour votre altruisme, que Dieu vous récompense sur cette terre et à l'au-delà.

♥ **Au peuple malien** : Vous m'avez tout donné sans rien demandé au retour. Je crois en vous et je suis si fière d'appartenir à ce brave peuple.

A tous ceux qui de loin ou de près ont contribué directement ou indirectement à la réalisation de ce travail ainsi qu'à tous ceux qui ont été involontairement omis.

AUX MEMBRES DU JURY :

♥ A notre maître et président du jury

Le professeur Anatole Tounkara

- *Maître de conférence agrégé d'immunologie ;*
- *Directeur du Centre National de Transfusion Sanguine (CNTS) ;*
- *Chargé de cours à la faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie (FMPOS) ;*
- *Chef de DER de Sciences Fondamentales de la FMPOS ;*
- *Directeur du programme de recherche NIAID/NIH/FMPOS sur le SIDA et la Tuberculose.*

Cher maître,

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider ce jury de thèse malgré vos multiples occupations. En plus de vos qualités scientifiques, nous gardons de vous l'image du maître aux qualités humaines inestimables. Votre esprit d'ouverture et votre constante disponibilité font de vous un exemple de maître. Soyez assuré, cher maître, de notre profonde gratitude.

♥ A notre maître et juge

Le Professeur Flabou Bougoudogo

- *Professeur agrégé en Bactériologie-Virologie ;*
- *Directeur Général de l'Institut National de Recherche en Santé Publique (INRSP) ;*
- *Consultant auprès de l'OMS pour la surveillance des résistances bactériologiques.*

Nous sommes très honorés par votre présence dans ce jury. Vous avez bien voulu prendre un peu de votre temps si précieux et si bien planifié pour juger ce travail. Nous vous remercions très sincèrement.

♥ A notre maître et juge

Le Professeur Abdel-Kader Traoré

- *Maître de conférence agrégé en Médecine interne ;*
- *Diplômé en communication scientifique ;*
- *Chargé de cours de Sémiologie et d'endocrinologie à la FMPOS ;*
- *Directeur du Centre National d'Appui à la lutte contre la Maladie (CNAM).*

Cher maître,

Nous avons été d'abord séduit par votre détermination et votre volonté sans limite de participer à la formation des étudiants. Ce sont surtout votre bonté naturelle et votre courtoisie qui ont le plus retenues notre attention. Veuillez trouver ici, l'expression de notre reconnaissance et de notre profond respect.

♥ A notre maître et juge

Le Docteur Sounkalo Dao

- *Diplomé de Maladies infectieuses et Tropicales ;*
- *Praticien Hospitalier, Assisant chef de clinique ;*
- *Chargé de cours de Pathologie Infectieuse ;*
- *Clinicien du programme de recherche NIAID/NIH/FMPOS sur le SIDA et la Tuberculose.*

Nous nous réjouissons de la disponibilité avec la quelle vous avez participé à la réalisation de ce travail. Veuillez accepter nos remerciements les plus sincères.

♥ A notre maître et directeur de thèse

Le Docteur Ousmane Koita

- *Responsable du laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée de la Faculté des Sciences et Techniques (FAST) ;*
- *Directeur adjoint du programme de recherche NIAID/NIH/FMPOS sur le SIDA et la Tuberculose ;*
- *Chargé de cours de Biologie Moléculaire à la FAST.*

Cher maître, vous nous faites un grand honneur à nous confiant ce travail. Vous avez fait preuve d'une grande disponibilité et d'une gentillesse à notre égard.

Votre rigueur dans le travail, votre désir de transmission du savoir font de vous un grand homme de science. Nous vous prions, d'accepter, l'expression de notre estime et de notre attachement indéfectible.

LISTE DES ABREVIATIONS ET DES SIGLES :

- **AA** : Acide Aminé
- **ADN** : Acide Désoxyribonucléique
- **ARN** : Acide Ribonucléique
- **ARV**: Antirétroviraux
- **bADN** : ADN branché
- **cADN** : ADN complémentaire
- **CD** : Cluster of Differentiation
- **CDC** : Centers for Diseases Control and Prevention
- **CRF** : Circulating Recombinant Forms
- **DMSO** : Diméthyl-sulfoxyde
- **EDSM-III** : Enquête Démographique de Santé du Mali
- **ELISA** : Enzyme Linked Immunosorbant Assay
- **ELISpot** : Enzyme Linked Immunospot
- **FAST** : Faculté des Sciences et Techniques
- **FMPOS** : Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie
- **GAIA** : Global action to Immunize against AIDS
- **HLA** : Human leukocyte Antigen
- **HTLV** : Human T-cell Leukemia Virus
- **IFI** : Immunofluorescence Indirecte
- **INF- γ** : Interferon- gamma
- **INTI** : Inhibiteur Nucléosidique et Nucléotidique de la TI
- **INNTI** : Inhibiteur Non Nucléosidique de la Transcriptase Inverse
- **Kb** : Kilobase
- **LAV** : Lymphadénopathie Associated virus
- **LTR** : Long Terminal Repeat
- **PBMCs** : Peripheral Blood Mononuclear Cells
- **PBS** : Phosphate Buffer Saline
- **PCR** : Polymerase Chain Reaction
- **PHA** : Phytohémaglutinine A
- **PM** : Poids Moléculaire
- **PNLS** : Programme National de Lutte contre le SIDA
- **PVD** : Pays en Voie de Développement

- **SIDA** : Syndrome d'Immunodéficience Acquise
- **VHB** : Virus de l'Hépatite B
- **VHC**: Virus de l'Hépatite C
- **VIH** : Virus de l'Immunodéficience Humaine
- **VIS** : Virus de l'Immunodéficience Simienne
- **OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- **ONUSIDA** : Organisation des Nations Unies pour la lutte contre le SIDA
- **RIPA** : Radioimmunoprécipitation
- **tARN** :ARN de transfert
- **TI** : Transcriptase Inverse
- **USA** : United States of America
- **WB** : Western Blot
- **%** :Pourcentage

SOMMAIRE :

INTRODUCTION	1
OBJECTIF	6
Objectif général	7
Objectifs spécifiques	7
1- GENERALITES	8
1-1. Définition des rétrovirus	9
1-2. Historique	9
1-3. Caractères généraux et Classification des rétrovirus	12
1-4. Biologie	14
1-5. Epidémiologie	32
1-6. Pouvoir pathogène du VIH	41
1-7. Methodes de diagnostic	49
1-8. Méthodes d'étude de la réponse T	59
1-9. Molécules antirétrovirales	61
1-10. Prévention	63
1-11. Recherche vaccinale	64
2- METHODOLOGIE	68
2-1. Lieux d'étude	69
2-2. Type et Période d'étude	71
2-3. Population d'étude	71
2-4. Préparation des échantillons au CNTS	72
2-5. Etablissement de la carte des épitopes par les outils de Bioinformatique	73
2-6. Enzyme linked Immunospot: ELIspot	77
2-7. Considérations éthiques	81
2-8. Saisie et Analyses des Données	81
3- RESULTATS	82
4- COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS	101
5- CONCLUSION	106
6- RECOMMANDATIONS	108
REFERENCES BLIBLIOGRAPHIQUES	110

INTRODUCTION

INTRODUCTION :

L'émergence du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) a bouleversé les structures sanitaires partout dans le monde et plus particulièrement dans les régions les plus défavorisées.

Cette infection est causée par un rétrovirus à ARN (acide ribonucléique) : le VIH, Virus de l'immunodéficience Humaine qui appartient à la sous-famille des *lentivirus*. Il parasite électivement certaines cellules de l'immunité cellulaire (1). Deux types de VIH ont été identifiés : le VIH-1 et le VIH-2. Le virus le plus répandu dans le monde est le VIH-1, le VIH-2 est surtout rencontré en Afrique occidentale, mais il a aussi été retrouvé en Europe, en Asie et en Amérique latine (2).

Le VIH/SIDA touche actuellement tous les pays du monde et l'ampleur prise par la pandémie a dépassé les prévisions les plus pessimistes. Le rapport ONUSIDA/OMS de décembre 2003 fait mention d'environ 40 millions de personnes vivant avec le VIH à travers le monde, dont 2,5 millions d'enfants de moins de 15 ans (3). Pour l'année 2003, le SIDA a tué plus de 3 millions de personnes, et on estime à 5 millions le nombre de personnes nouvellement infectées.

L'Afrique subsaharienne avec 26,6 millions de personnes infectées reste la région la plus durement touchée. Cependant la prévalence du VIH varie considérablement à travers le continent. Les prévalences les plus élevées se rencontrent dans les pays d'Afrique australe comme le Botswana, le Lesotho, la Namibie et le Swaziland (presque 39%). En Afrique de l'ouest, le taux de

prévalence demeure relativement bas; la situation la plus grave est celle de la Côte d'Ivoire (plus d'une femme sur 10 est séropositive) alors que dans certains pays du Sahel (Niger, Mauritanie), la prévalence ne dépasse pas 1% (3).

Au Mali la prévalence globale du VIH/SIDA estimée selon le rapport de la troisième enquête démographique de santé du Mali EDSM- III de décembre 2001 était de 1,7% avec des extrêmes dans les régions de Bamako 2,5% et de Gao 0,6% (4).

Dans ces Pays démunis, le SIDA est devenu un problème majeur de santé publique et de développement. Il a déstabilisé les établissements déjà fragiles par la pauvreté, les guerres civiles, la malnutrition, les autres maladies transmissibles, compromettant ainsi la réalisation des programmes de lutte contre les affections tropicales et le développement durable des populations.

L'insuffisance actuelle des moyens de prévention, la flambée épidémique de la maladie dans le monde et ses conséquences sur le plan humain, économique et social, conjuguées aux limites des traitements actuels et à leur indisponibilité pour la majorité des malades, rendent prioritaire la recherche d'un vaccin contre l'infection par le VIH. Les connaissances actuelles montrent qu'il sera possible d'obtenir une protection vaccinale partielle par l'induction d'une réponse cellulaire forte et multiépitopiques (5). Un vaccin de ce type n'empêcherait pas l'infection mais diminuerait la

charge virale lors de la primo-infection et permettrait d'augmenter la période d'évolution asymptomatique de la maladie. Ceci pourrait permettre l'épargne du recours aux antirétroviraux (ARV) pendant plusieurs années pour de nombreux malades. De plus en réduisant la virémie moyenne

dans la population, la vaccination aurait un effet sur la transmissibilité du virus et donc un impact en santé publique.

Cependant l'obstacle majeur du développement d'un tel vaccin est le grand polymorphisme des gènes de Classe I et II du système HLA (Human Leukocyte Antigen) et la diversité génétique du VIH (2). Les souches de VIH sont nombreuses avec apparition continue de variants. La modification des séquences des acides aminés par des séries de mutations et de recombinaisons entraîne l'émergence de nouvelles souches. Le virus qui a infecté un sujet peut ne plus être le même lorsque la maladie atteint son issue fatale.

Pour concevoir ce vaccin, des études préliminaires sont nécessaires pour proposer de nouveaux immunogènes reconnus par des haplotypes HLA les plus répandues dans la population. Les antigènes ou épitopes utilisés pour l'immunisation doivent correspondre à des régions suffisamment vitales pour le virus, c'est à dire les mieux conservées afin que les mutations ne puissent s'y accumuler.

Dans notre pays aucune étude pour tester cette approche n'a été menée jusqu'à ce jour. C'est ainsi qu'avec la collaboration entre chercheurs maliens, Brown University, Providence (RI, USA) et la fondation GAIA (Global Action to

Immunize against AIDS) ; nous avons évalué la réponse immunitaire cellulaire à des peptides synthétiques issus de protéines provenant des diverses souches de VIH-1 en estimant la production de l'interferon-gamma (IFN- γ) par les cellules immunocompétentes spécifiques du VIH (Lymphocytes T CD4+ auxiliaire, T CD8+cytotoxique: CTL). Les résultats de cette thèse contribueront à valider puis à sélectionner les épitopes les plus conservés et les plus immunogènes qui peuvent être candidats pour l'élaboration d'un vaccin global contre tous les sous-types du VIH-1.

OBJECTIF

OBJECTIF :

Notre étude a pour objectif

OBJECTIF GENERAL :

Evaluer la réponse immunitaire cellulaire induite par des épitopes obtenus à partir des protéines du VIH-1 chez les donneurs bénévoles de sang découverts séropositifs.

OBJECTIFS SPECIFIQUES :

- Estimer la production d'IFN- γ par les cellules T CD4+ et CD8+ après leur stimulation par les épitopes.
- Estimer l'immunogénicité des épitopes en fonction de la nature des protéines majeures du VIH-1.
- Identifier les épitopes les plus immunogènes.

GENERALITES

1- GENERALITES :

1-1. DEFINITION DES RETROVIRUS :

Les rétrovirus sont des virus à ARN dont la réplication se fait *via* un ADN intermédiaire dit proviral. Cette transcription rétrograde du matériel génétique est due à la présence de la transcriptase inverse (TI) (6).

1-2. HISTORIQUE :

Les premiers cas de Sida ont été décrits aux États-unis, en 1981 quand le centre de contrôle et de prévention des maladies d'Atlanta : CDC (Centers for Diseases Control and prevention) fut informé de l'utilisation de la pentamidine pour traiter cinq jeunes adultes atteints d'une forme particulièrement grave de pneumocystose pulmonaire (7). Le même phénomène va être observé chez des homosexuels et des toxicomanes avec une altération grave de l'immunité cellulaire. En ce moment-là, on ne parlait pas encore de SIDA pour décrire ce nouveau syndrome : il portait plusieurs noms, entre autres le «GRID » (Gay Related Immune Deficiency)(8).

Avec la découverte de cas similaires chez des hétérosexuels et les hémophiles américains, les épidémiologistes ont d'emblée pensé à une transmission par un agent pathogène présent dans le sang et les humeurs.

La mise en évidence de virus était toutefois complexe, car les sujets étudiés étaient infectés par toutes sortes de pathogènes opportunistes. On accusa alors des virus du groupe herpes, en particulier le Cytomégalovirus et le virus d'Epstein Barr mais ces isolats n'avaient aucune spécificité par rapport aux prototypes pour expliquer cette nouvelle affection (9).

L'existence des cas semblables de déficits immunitaires chez les animaux tel que le *Feline leukemia Virus* : FeLV (chez le chat) et le tropisme des premiers rétrovirus humains HTLV-I et II (Human T-cell Leukemia Virus) pour les lymphocytes T ont permis à Robert Gallo et Myron Essex de suggérer très rapidement l'hypothèse rétrovirale. En s'appuyant sur des enquêtes séro-épidémiologiques, ils montrèrent la présence d'anticorps anti-VIH-1 chez certains malades, mais comme les signes d'infection par HTLV étaient inconstants chez les patients atteints du SIDA, ils postulèrent que ce virus ou un très proche variant était l'agent causal du SIDA (10, 11).

Courant 1982, les médecins français commencent à se mobiliser avec l'apparition en France de cas similaires. Après un certain nombre de recherche, une équipe de l'institut Pasteur dirigée par Luc Montagnier avec F. Barré Sinoussi et Jean Claude Cherman a détecté l'activité transcriptase inverse du virus suivie d'une mort cellulaire dans le surnageant de culture de cellules ganglionnaires d'un patient atteint de lymphadénopathie généralisée c'est-à-dire le stade pré-Sida. Ce n'est qu'en 1983 qu'ils isolèrent un virus qu'ils nommèrent LAV (lymphadenopathie Associated Virus) (12). Cet effet cytopathogène distinguait donc fondamentalement le LAV des HTLVs, qui sont transformants. La caractérisation du LAV a été poursuivie et son rôle étiologique dans le SIDA et les lymphadénopathies fut établi. L'année suivante Gallo et *al.*, annonce l'isolement et la caractérisation du HTLV-III très proche du LAV (13). Plus tard d'autres isolats tel que l'ARV (Aids-Related-virus) seront tenus responsables de l'infection. L'analyse moléculaire des génomes clonés a confirmé l'appartenance du virus du SIDA à un groupe rétroviral bien distinct de celui des HTLVs et que le LAV était identique au

HTLV-III mais présentait des variations locales qui ne modifiaient pas son génome et ses propriétés biologiques.

Dans la même foulée un deuxième virus nommé HIV-2 fut identifié en 1985 puis isolé en 1986 chez des malades d'origine africaine. Ce type est aujourd'hui responsable d'un nouveau foyer de SIDA en Afrique de l'Ouest (14).

En 1986, ces problèmes de nomenclature vont trouver leur épilogue avec l'adoption de la terminologie VIH pour : Virus de l'Immunodéficience humaine (15) ; et pour freiner la polémique entre chercheurs français et américains, un accord concernant le partage des droits de découverte sera signé par les deux équipes en 1987.

Depuis ce jour, de nombreuses avancées furent obtenues notamment: le développement industriel des tests de diagnostic, la mise au point des premières molécules anti-rétrovirales et l'espoir d'avoir un jour un vaccin efficace pour enrayer ce fléau qu'est le SIDA.

1-3. CARACTERES GENERAUX ET CLASSIFICATION DES RETROVIRUS :

1-3-1. Caractères généraux :

Les rétrovirus ont en commun un certain nombre de caractéristiques (6) :

- ce sont des virus à enveloppe dont le matériel génétique est constitué d'ARN ;

- leur mode de réplication est caractérisé par l'association intime de la réplication virale avec les fonctions cellulaires qui sont: la TI, (qui est une ADN-polymerase ARN dépendante, permettant de synthétiser l'acide désoxyribonucléique (ADN), bi-caténaire complémentaire de l'ARN viral, dans le cytoplasme de la cellule infectée par le virus) et la présence d'une séquence répétitive (de taille variable) aux deux extrémités de l'ADN double brin appelée LTR (Long Terminal Repeat).

- le génome est unique pour plusieurs raisons :

- il présente une grande homologie avec les ARNs messagers des eucaryotes avec l'extrémité 5' en coiffe et une séquence polyadénylée en 3' ;
- ils sont les seuls virus diploïdes connus à ce jour;
- on les trouve toujours en association avec des ARNs de faible poids moléculaire tel que l'ARN de transfert cellulaire (tARN) qui sert d'amorce pour la synthèse du nouveau ADN ;
- Ils comportent trois gènes majeurs à l'origine de trois groupes de protéines virales : le *gag* (gène de l'antigène de groupe), code pour les protéines de la nucléocapside ou core ; le gène *pol* (polymérase) code pour la TI ; le gène *env* (enveloppe) code pour des glycoprotéines constituant une partie de l'enveloppe.

1-3-2. Classification des rétrovirus :

Selon WEISS et *al.*, (16) la grande famille des *rétroviridae* est constituée de trois sous-familles : les *lentivirus*, les *oncorvirus*, *spumavirus*.

- Les *lentivirus* regroupent toutes les classes de rétrovirus ayant un pouvoir lytique, mais dépourvu de pouvoir immortalisant ou transformant. Ces agents pathogènes entraînent des infections lentes toujours mortelles. Le VIH est un lentivirus typique ; il a la capacité de se répliquer continuellement dans la cellule et d'intégrer son génome. Il obtient ainsi un important moyen d'échapper à la surveillance immune. Cette famille comprend, entre autres, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1 et VIH-2) ; le virus de l'immunodéficience simienne (VIS) ; et le virus Visna-Maedi (responsable de pneumopathies et de neuropathies) ; aussi le virus de l'anémie infectieuse équine (EIAV), le virus de l'encéphalite caprine (CAEV) et beaucoup d'autres.

- Les *oncorvirus*, comme leur nom l'indique (oncogène, RNA, virus), ce sont des virus oncogènes induisant des leucémies, des lymphomes et des sarcomes. A titre d'exemple on peut citer le virus responsable du sarcome de Rous

- Les *spumavirus*, ont été isolés dans les cultures cellulaires humaines et animales, mais leurs implications en pathologie n'est pas connue (16).

1-4. BIOLOGIE :

1-4-1. Structure-Organisation:

1-4-1-1. Morphologie :

L'ultrastructure du VIH mature montre une particule virale enveloppée grossièrement sphérique, de 90 à 120 nm de diamètre sortant de la cellule infectée par bourgeonnement à travers la membrane cytoplasmique. La membrane du virus est donc constituée d'éléments de la double couche phospho-lipidique cellulaire dans laquelle sont insérées les protéines virales. Ces protéines sont des glycoprotéines qui s'associent pour former des excroissances en spicules. Elles comprennent une molécule hydrophobe transmembranaire, gp41 à laquelle est attachée par des liaisons faibles une protéine externe glycosylée hydrophobe et de haut poids moléculaire, la gp120.

A l'intérieur du virion, on observe un cylindre dense allongé, plus ou moins sphérique appelé core virale constitué d'éléments structuraux du groupe antigène, deux molécules d'ARNs de même polarité (positive), ainsi que les enzymes virales à savoir la TI, l'endonuclease/intégrase et la protéase (**18**) (voir figure 1)

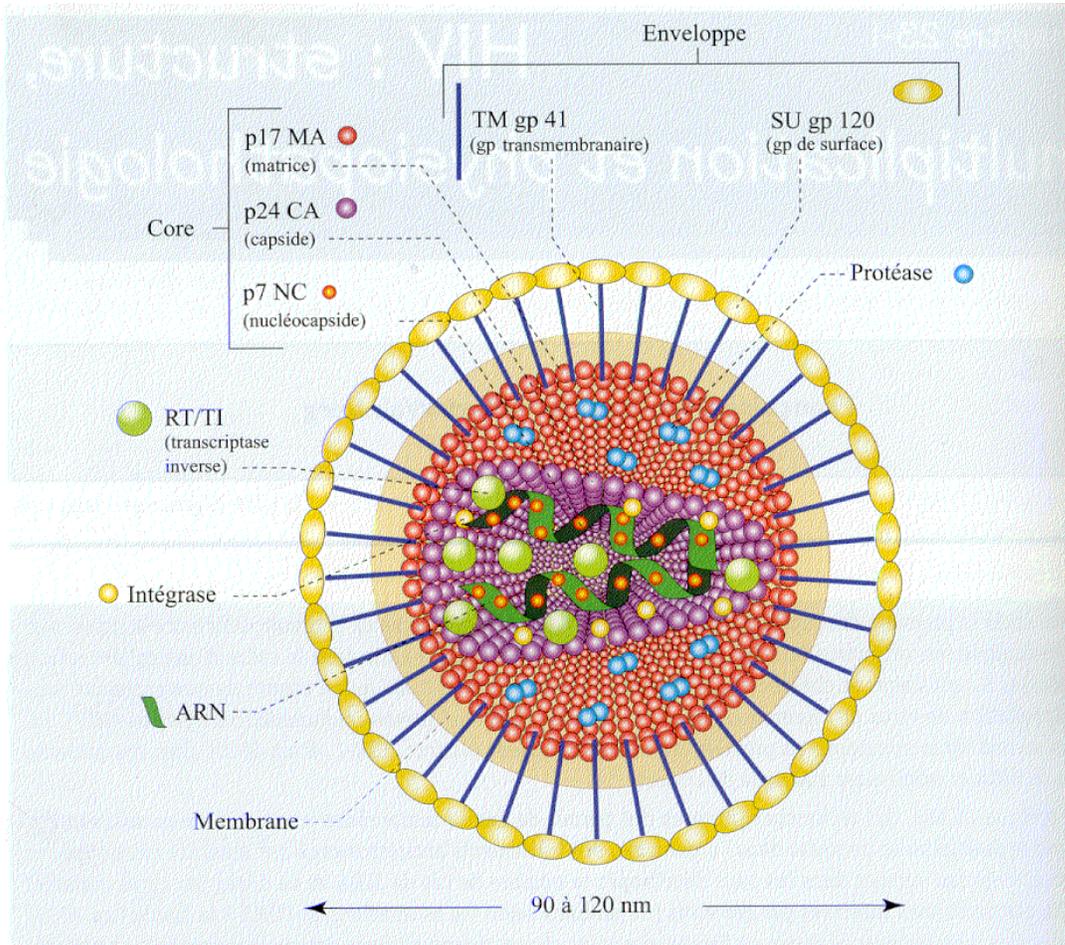


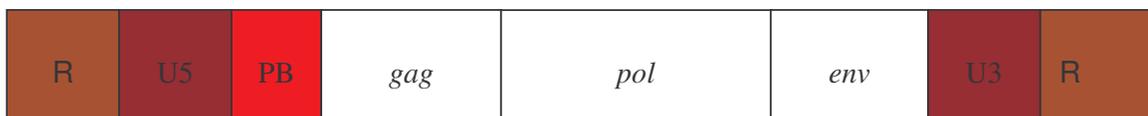
figure 1: Représentation schématique du VIH-1 (d'après Jean-Marie Hureau 2003, Réf : N°18).

1-4-1-2. Organisation du génome viral :

L'organisation génétique des VIHs est très complexe mais elle est essentielle pour comprendre les mécanismes de l'infection à VIH.

Les VIHs sont des virus eucaryotiques dont le génome diploïde est constitué de deux copies d'ARNs simple brin de faible longueur, inférieure à 10 kilobases (Kb). Leur matériel génétique est représenté schématiquement comme suit (19) : les extrémités 5' et 3' se terminent par une séquence non codante répétée appelée R ; Du côté de l'extrémité 5', la séquence R est suivie d'une séquence non codante appelée U5 et d'une courte séquence, PB (Primer Binding Site). La séquence de PB est parfaitement complémentaire de l'extrémité 3' du tARN qui sera utilisé comme amorce pour initier la rétrotranscription; puis commence la partie codante constituée des trois gènes habituels des rétrovirus : *gag*, *pol*, *env* et 6 gènes supplémentaires propre aux VIHs jouant un rôle important dans les phénomènes de régulations (*tat*, *nef*, *rev*, *vif*, *vpr*). Le VIH-1 possède un gène dénommé *vpu* qui n'existe pas dans le génome du HIV-2 ; à l'inverse seul le VIH-2 possède un gène désigné provisoirement : *vpx*.

Figure 2 : Représentation simplifiée du génome du VIH-1.



a- Le gène *gag* ou groupe antigène : (20)

Il synthétise une polyprotéine intracellulaire de 55 kilodalton (Kd). Ce précurseur sera clivé par la protéase virale p10 en trois protéines constitutives du core :

- la protéine majeure de capsid p24 (PM 2400) ;
- la Phosphoprotéine N-terminale, protéine de matrice p17 (PM 1700) ;
- la nucléoprotéine C-terminale p15 (PM 1500), elle-même clivée au cours de la maturation en deux protéines p7, p9.

b- Le gène *pol* :

Il code pour trois enzymes virales qui sont respectivement :

- la protéase p10 indispensable au clivage du précurseur *gag* p55 ;
- la TI sous deux formes moléculaires p64 et p53 ;
- l'endonuclease/intégrase p34.

c- Le gène *env* :

Ce gène code pour un précurseur glycosylé intracellulaire de 160 Kd (gp160) clivé dans le cytoplasme par une protéase cellulaire en deux glycoprotéines : la gp120 (protéine de surface) et la gp41 (transmembranaire).

1-4-1-2-2. Les gènes supplémentaires du VIH-1 : (19)

a- Le gène *tat* (Trans activator) :

Il est à l'origine d'une protéine virale de 86 acides aminés (AA), le Tat. Il comprend deux exons codants dont le principal est situé dans la zone séparant *pol* et *env* et code pour l'essentiel de la protéine (72 AA), l'autre exon fournit les 14 derniers AA qui ne sont pas indispensables à l'activité

biologique. La protéine Tat est localisée dans le noyau, elle intervient dans l'activation de l'expression du virus. La séquence cible pour la transactivation désignée par TAR en anglais Trans-activation Responsive est située au niveau dans l'élément R du LTR.

b- Le gène *rev* (régulation de l'expression du virus) :

Ce gène code pour une phosphoprotéine virale Rev indispensable à l'expression du virus. Il comprend également deux exons, mais contrairement à *tat*, l'exon essentiel est celui situé près de l'extrémité 3' de *env*. Le récepteur de la protéine Rev au niveau de l'ARN viral est le RRE pour Rev Responsive Element.

c- Le gène *nef* (negative expression factor) :

Il est situé à l'extrémité 3' de la partie codante du génome viral. Il est à l'origine d'une protéine cytoplasmique le Nef qui serait impliquée dans la régulation négative de l'expression du virus par l'intermédiaire d'une séquence située dans le DNA proviral: NRE pour Negative-Regulatory Element.

d- Le gène *vif* (Virus infectivity factor) :

Il code pour un polypeptide à localisation cytoplasmique, le Vif. La protéine Vif intervient dans l'infectivité du virus. A son absence, les virus libérés par la cellule ne sont pas pratiquement infectieux, de même la transmission intercellulaire du virus est partiellement altérée.

e- Le gène *vpr* (Viral protein r) :

Il code pour une protéine Vpr qui semble être capable d'activer l'expression de certains gènes cellulaires. Son action se traduit par une accélération du taux de réplication.

f- Le gène *vpu* (viral protein u) :

La protéine codée par cette dernière participerait à la maturation du virus. En son absence de nombreux virions restent soit dans la cellule, soit accrochés à la membrane plasmique.

1-4-1-3. Génome du provirus :

Le génome viral est transformé dans le cytoplasme de la cellule infectée en une seule copie d'ADN double brin grâce à la TI. Cette rétrotranscription suit un mécanisme très complexe et aboutit à la création des LTR aux extrémités de l'ADN complémentaire (cADN) (voir figure 3). Après circularisation ce dernier migre dans le noyau et intègre le génome cellulaire. Les LTR sont constitués des régions U3, R, U5 et permettent l'insertion du virus dans l'ADN génomique et contiennent des séquences nécessaires à la transcription du provirus. Bien que ces séquences soient identiques, elles ne jouent pas le même rôle selon qu'on les retrouve à l'extrémité 5' ou 3' :

- au niveau de l'extrémité 5' le LTR joue le rôle de promoteur fort de transcription ; on y retrouve : CAAT box, TATA box, le site d'initiation de la transcription et un enhanceur ;
- au niveau de l'extrémité 3' le LTR est un promoteur non spécifique capable d'activer tout gène endogène ou non situé à proximité.

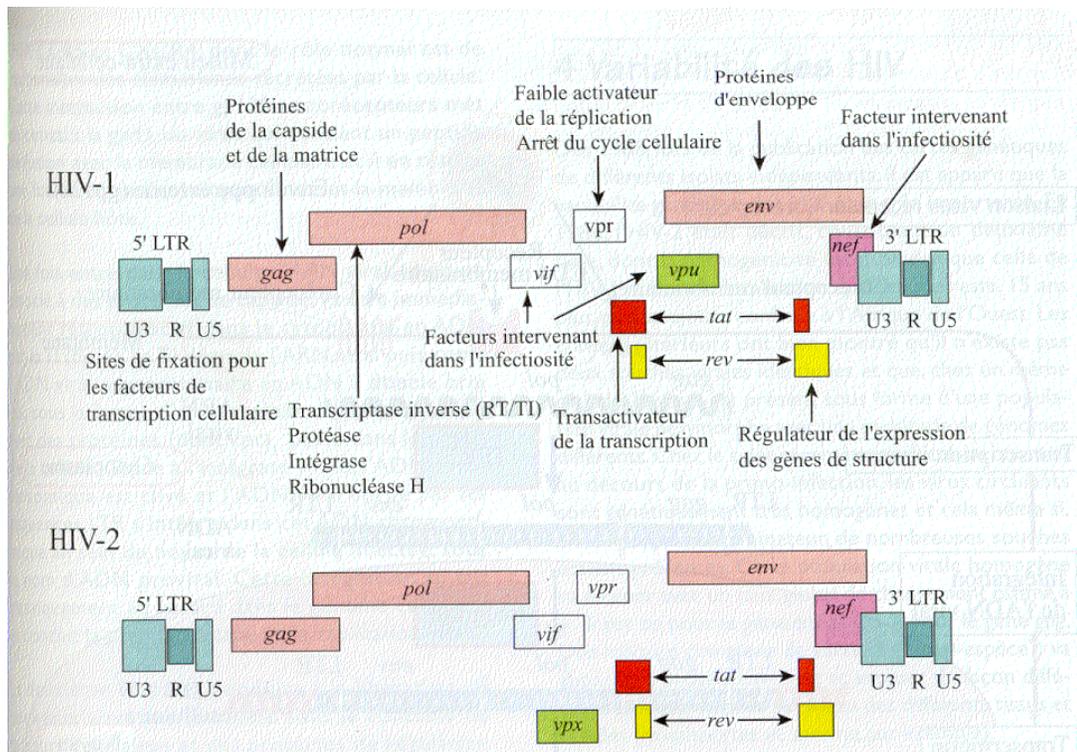


figure 3: Représentation Schématique du Génome du provirus (d'après Jean-Marie Hureau 2003, Réf : N°18).

1-4-2. Cellules cibles du VIH et Réservoirs cellulaires : (18, 20)

Les cellules cibles du VIH sont caractérisées par la présence, à leur surface du récepteur CD4, sur lequel viendra se fixer le virus. Deux groupes de cellules ont été répertoriés ; les lymphocytes T CD4+ et les cellules présentatrices de l'antigène. La disparition progressive des lymphocytes T CD4+ est la marque du SIDA. La grande majorité de la réplication virale (99%) se passe dans ces cellules activées dans les organes lymphoïdes et les autres tissus libérant dans le plasma des virions dont la demi-vie est estimée à quelques heures. Les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) sont les monocytes sanguins, les macrophages tissulaires et les cellules dendritiques. Ces dernières sont présentes dans le thymus, la peau (cellules de Langherans), les muqueuses, les organes lymphoïdes, le système nerveux central et le sang périphérique.

La fixation du gp120 sur le récepteur CD4 entraîne un changement conformationnel qui permet l'accessibilité à des co-récepteurs, appartenant à la famille des récepteurs chémochiniques. Ces derniers coopèrent avec le CD4 pour permettre l'entrée du virus dans la cellule. On distingue le CCR5 sur le macrophage, le CXCR4 sur les lymphocytes T. D'autres co-récepteurs jouant un rôle mineur ont été mis en évidence, ce sont le CCR3, le CCR2 et le CXCR1.

Selon leur tropisme pour ces cellules et selon la nature et le type de chémokines, les isolats viraux peuvent être classés en trois souches :

- les souches M-tropiques, dont le tropisme est restreint aux monocytes-macrophages. Ils étaient auparavant décrits comme des virus NSI :

non syncytium inducing, du fait de la faible production de syncytia *in vitro* ;

- les souches T-tropiques ou X4, autrefois appelées SI : *syncytium inducing*, qui reconnaissent la lignée cellulaire T ;
- les souches M-T-tropiques ou R5X4 ont un double tropisme .

1-4-3. Cycle de réplication :

Les différentes étapes de ce cycle sont essentielles pour comprendre à la fois la physiopathologie, le traitement et les stratégies vaccinales qu'on peut chercher contre l'infection à VIH/SIDA (voir figure 4).

1-4-3-1. Attachement et Pénétration :

Les glycoprotéines d'enveloppe jouent un rôle primordial dans cette première étape. Quand le virion vient en contact avec la surface de la cellule, le premier point de contact spécifique se fait entre la gp120 et la glycoprotéine CD4. L'interaction entre gp120, CD4, et les co-récepteurs : CCR5 ou CXCR4 entraînent le démasquage du domaine fusogénique hydrophobe situé à l'extrémité N-terminal de la gp41 et la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire.

1-4-3-2. Internalisation :

Après s'être fixé à la cellule, le virus pénètre dans la cellule et se libère de son enveloppe : c'est la décapsidation. Elle aboutit à la libération de l'ARN dans le cytoplasme.

1-4-3-3. La rétrotranscription :

Après décapsidation, l'ARN viral est transcrit en ADN intermédiaire double brin grâce à la TI. La particularité de cette enzyme est qu'elle possède quatre activités différentes qui vont lui permettre à elle seule de synthétiser la copie d'ADN à partir de l'ARN viral. Ces dites activités dites sont : **(19)**

- l'activité transcriptase inverse proprement dite ;
- l'activité Rnasique vis à vis des ARN hybrides à l'ADN ;
- l'activité ADN polymérase ADN dépendante ;
- l'activité de cassure spécifique à l'extrémité 5' de la séquence U3.

Les étapes de cette transcription inverse sont les suivantes :

- l'hybridation de la tRNA à PB (on obtient alors un court fragment d'ADN complémentaire jusqu'à l'extrémité 5' ;
- la destruction de la séquence R-U5 grâce à l'activité RNase H de la transcriptase inverse ;
- l'hybridation de la séquence R de l'extrémité 3' avec la petite portion d'ADN néo-synthétisé : c'est la circularisation ;
- la rétrotranscription complète du RNA viral donne un ADN simple brin (cADN) ;
- la coupure spécifique au niveau de la liaison env-U3 et la destruction de U3-R du faite de l'activité RNase H ;
- la synthèse de la séquence U3-R-U5 sous forme d'ADN grâce à l'activité ADN polymérase ADN dépendante. Cette synthèse sera arrêtée au niveau du tARN faute de matrice ;
- la destruction du tARN et de tous les brins d'ARNs restants et l'hybridation des deux séquences PB ;

- la synthèse du second brin d'ADN et la terminaison du premier (on obtient ainsi une molécule d'ADN bicaténaire circulaire avec les LTR à ses deux extrémités).

1-4-3-4. Intégration :

L'ADN viral migre vers le noyau, et intègre le patrimoine génétique de l'hôte grâce à une enzyme virale appelée l'intégrase ou endonucléase. Sa forme circulaire fait que, l'enzyme intervient de telle sorte que son extrémité 3' se soude avec l'extrémité 5' de l'ADN chromosomique. Cet ADN intégré dans le génome cellulaire porte le nom d'ADN proviral.

1-4-3-5. Transcription du gène viral :

Une fois intégré dans le génome de l'hôte, le provirus se comporte comme une unité de transcription indépendante avec son propre promoteur. L'ADN proviral est transcrit par l'ARN polymérase II de l'hôte. Après un processus d'épissage, l'ARN précurseur donne des ARN messagers qui transportés dans le cytoplasme sont traduits en protéines non clivées.

1-4-3-6. Assemblage et libération :

Les précurseurs des protéines tel que la gp160 sont clivés par une protéase cellulaire. L'assemblage de la particule virale est initié par la polymérisation du précurseur p55. Cette protéine interagit avec les constituants de l'enveloppe qui ont migré et qui se sont insérés au niveau de la membrane cellulaire indépendamment du core, et d'autre part avec les ARNs génomiques qui se trouvent encapsidées. Les protéines et l'ARN sont alors assemblés pour donner des structures sphériques immatures (contenant chacune deux brins d'ARN), qui bourgeonnent à la surface de la cellule et s'enveloppent en se libérant de la cellule. La maturation du virion, qui lui

confère son caractère infectieux, a lieu après sa libération. Les particules virales complètes sont libérées, elles vont à leur tour infecter d'autres cellules cibles de l'organisme, accélérant ainsi la dissémination.

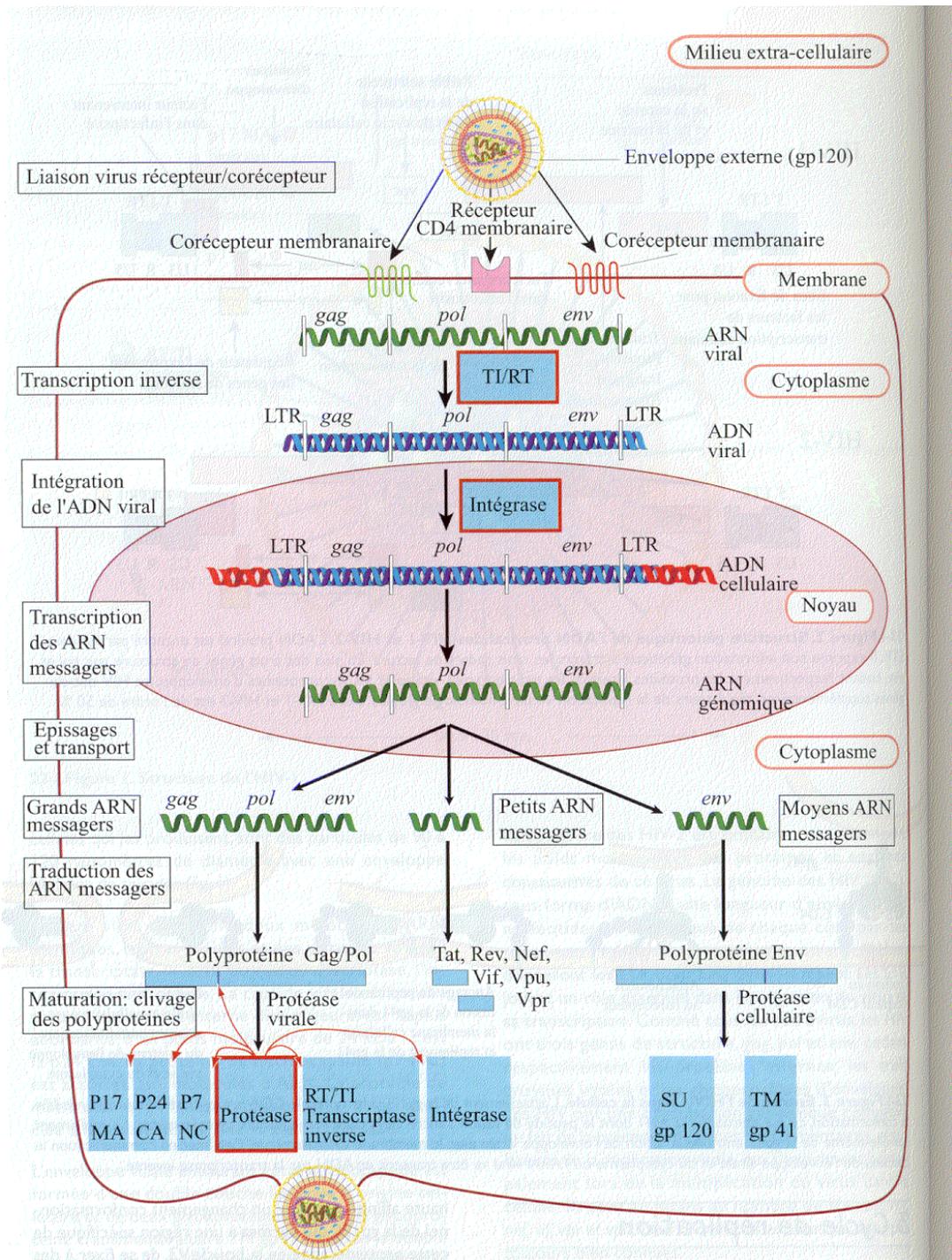


figure 4: Cycle de réplication du VIH-1 (18).

1-4-4- Stabilité physico-chimique :

Le VIH étant un virus enveloppé, il est sensible aux solvants des lipides et aux détergents. Il ne résiste pas à la chaleur puisqu'il est inactivé à 56°C pendant 30mn et également par traitement pendant 5 mn à l'hypochlorite de sodium à 0,2%, l'éthanol à 70%, le glutaraldéhyde à 0,2% (20).

1-4-5. Diversité génétique des VIH :

Une variabilité importante est retrouvée chez tous les lentivirus humains et simiens. L'une des caractéristiques des VIH est la génération d'un grand nombre de mutants pendant toute la durée de l'infection : c'est la diversité génétique. Ce phénomène est dû à la rapide multiplication du virus à l'intérieur des cellules infectées (production quotidienne d'environ 10^9 - 10^{10} virions par l'hôte) et au taux élevé de mutation lié à l'infidélité de la TI (une erreur sur 10000 bases par cycle de réplication) (20). La variabilité n'est pas la même tout au long du génome : *gag* et *pol* sont relativement conservés alors que *env* est très variable. A l'intérieur de la gp120, on distingue des zones hypervariables ou boucles (V), séparées par des régions constantes (C).

La technique de référence pour analyser la variabilité des VIH est l'étude des séquences nucléotidiques des gènes *env* (région V3 et C2) et *gag*. Ensuite un arbre phylogénétique est établi à l'aide de programmes informatiques pour étudier les liens génétiques entre les différents isolats. La longueur des branches de l'arbre traduit l'étendue de la divergence entre ces isolats (21).

1-4-5-1. Classification des VIH :

Actuellement, il existe deux types majeurs de VIH : le VIH-1 et le VIH-2 qui résulteraient de deux transmissions zoonotiques : le premier à partir du chimpanzé : *Pan troglodytes* (SIVcpz) et le second à partir du macaque : *Sooty mangabey* (SIV mac) (22). Les études phylogénétiques laissent supposer que ces virus ont un ancêtre commun. Le VIH-1 et le VIH-2 présentent moins de 50% d'homologie, alors que les isolats de VIH-1 ne diffèrent pas de plus de 20% entre eux.

1-4-5-1-1. Classification du VIH-1 :

Depuis 1998, les VIH-1 ont été classés en trois groupes : M, N, O (23).

1-4-5-1-2. Le groupe Majeur (M) :

Il inclut la quasi-totalité des variants isolés de par le monde et est lui-même séparé en 11 sous-types de A à K. La différence des séquences nucléotidiques du gène *env* entre les différents sous-types est de 20-30%. A l'intérieur d'un même sous-type, les divergences sont de l'ordre de 5-20% (23).

Des sous groupes peuvent exister au sein des sous-types ; ils correspondent à des isolats géographiquement liés. Par exemple, on distingue à l'intérieur du sous-type E, des souches très proches originaires du Thaïlande formant un sous groupe différent des souches de sous-type E rencontrées en Afrique (24).

L'analyse cladogénétique se complique d'avantage par la fréquence de virus recombinants appelés également mosaïque : Forme recombinante en

circulation (CRF)(25). Ce sont des formes hybrides qui résultent de l'évolution du virus par des phénomènes de recombinaison entre différents sous-types viraux lors de co-infections chez le même individu. Ce phénomène suggère que l'infection liée à une souche virale ne donne pas nécessairement une protection complète contre une autre infection avec une autre souche (20). Dans la classification actuelle du VIH-1 groupe M, on considère que les sous-types E (A/E) et I (A/G/I) sont des virus recombinants.

1-4-5-1-3. Le groupe Outlier (O) :

Il regroupe un nombre limité de variants très éloignés de M qui présenteraient près de 50% de divergence avec les autres VIH-1. Ces isolats sont retrouvés quasi-exclusivement chez des patients originaires d'Afrique centrale. L'épicentre de cette forme semble être le Cameroun où il représente 2 à 3% des VIH-1 (25).

1-4-5-1-4. Le groupe Nouveau (N) ou non-M et non-O:

Le premier isolat a été identifié en 1995 chez des patients camerounais (26). L'organisation génomique de la souche appartenant à ce groupe (YBF30) et la position des gènes de régulation de cette dernière étaient identiques à celles de VIH-1. Phylogénétiquement les gènes de structure de YBF30 sont à peu près équidistants de ceux du groupe M de VIH-1 et d'un virus isolé au Gabon (VIScpz-gab) ; plus éloignés du groupe O (27, 28).

1-4-5-1-2. Classification du VIH-2 :

La variabilité génétique du VIH-2 est moins importante que chez le VIH-1. Jusque la 6 sous-type ont été identifiés (A à F) (23) ; seul les deux premiers ont été convenablement caractérisés (29).

1-4-5-2. Limites de la classification : (20)

Malgré l'amplitude des études menées, il est indispensable de souligner l'aspect relatif et non définitif de la classification liée aux limitations techniques (séquençage uniquement de certaines régions). Certains génotypes sont définis par l'analyse d'un seul gène mais ne peuvent pas être individualisés si l'analyse est effectuée avec un autre gène. A titre d'exemple les isolats de génotype E identifiés grâce aux séquences *env* seront rattachés au génotype A si uniquement *gag* est pris en compte. De plus l'insuffisance des moyens épidémiologiques fait que les études sont effectuées uniquement dans certaines régions du monde et sur certaines populations.

1-5. EPIDEMIOLOGIE :

1-5-1. Caractère pandémique :

Le VIH, agent étiologique du SIDA est devenu depuis 2001 la première cause de mortalité en Afrique subsaharienne et la quatrième à travers le monde (30). Selon le dernier rapport de l'ONUSIDA, l'épidémie mondiale a tué plus de 3 millions de personnes en 2003, et on estime que 5 millions de personnes ont contracté le virus cette même année. Ce qui porte à 40 millions le nombre de personnes vivant avec le VIH dans le monde (3) (voir figure 4). La répartition du HIV-1 est mondiale. Cependant dans les pays industrialisés, l'épidémie concerne essentiellement certaines populations à risque (homosexuels masculins, toxicomanes) alors que dans les pays en voie de développement l'ensemble de la population globale est touché, du fait de la transmission hétérosexuelle. Sur les 15000 personnes contaminées chaque jour plus de 95% vivent dans ces pays (30) ou ils ont peu ou pas accès aux ARV les plus efficaces, aux méthodes de diagnostic et de suivi mais surtout à une politique de surveillance des souches virales. Contrairement au VIH-1, le VIH-2 est pratiquement restreint à l'Afrique de l'ouest, et pour l'instant peu diffusé dans les autres régions du monde. Les Pays occidentaux comme la France, le Portugal, l'Espagne sont les plus concernés par le VIH-2 de part leur proximité géographique et le flux d'immigration avec l'Afrique de l'Ouest (20).

L'Amérique latine et les caraïbes, constituent la seconde région la plus durement touchée après l'Afrique sub-saharienne avec 2 millions de séropositifs enfants et adulte compris. Ce chiffre comprend 200000

personnes nouvellement infectées. Le VIH/SIDA a tué au moins 100000 personnes à la même période (3).

Dans la région Asie et pacifique, l'épidémie émerge dans des pays jusque là indemnes (Chine, Indonésie, Viet Nam). Le nombre de malade est passé de 7,1 millions en 2001 à 7,4 millions en 2003 avec 500000 décès dus au VIH/SIDA (3).

Au moyen orient et au Maghreb, les données disponibles font état de 45000 individus décédés du VIH/SIDA et que 55000 personnes ont été contaminées par le virus en 2003, ce qui porte à 600000 le nombre de séropositifs (3).

L'Europe orientale et l'Asie centrale, ne donnent aucun signe de fléchissement, quelques 23000 nouveaux cas ont été déclarés en 2003, ce qui porte à 1,5 millions les nombres de personnes qui vivent avec le virus dans cette région. Là bas l'épidémie est alimentée à cause des comportements à risque tel que la consommation de drogues injectables et les rapports sexuels non protégés chez les jeunes (3).

Dans les pays à revenu élevé comme ceux d'Amérique du nord, d'Europe occidentale, 80000 nouvelles infections se sont produites en 2003. L'OMS estime que 1,6 millions de personnes vivent avec le VIH. Dans ces pays l'introduction de traitement antirétroviral à grande échelle a permis de diminuer la mortalité associée au SIDA ; Cependant, malgré cette évolution assez stable, on observe une propagation de l'épidémie vers des populations marginalisées (immigrés, réfugiés) qui n'ont pas toujours accès aux soins et à l'information (3).

L'Afrique subsaharienne est le continent le plus durement touché par le VIH/SIDA avec 26,6 millions de personnes vivants avec le virus dont 3,2 millions de nouvelles infections et 2,3 millions de personnes décédées.

La prévalence du VIH varie considérablement à travers le continent. Dans quelques pays d'Afrique de l'ouest et de l'Est, l'épidémie semble être maîtrisée grâce aux efforts suivis de prévention. Les pays d'Afrique australe tel que le Botswana, l'Afrique du sud, le Mozambique sont les plus durement touchés, car ils regroupent à eux seuls environ 30% du total des individus infectés dans le monde, alors qu'ils constituent moins de 2% de la population mondiale. Dans ces pays une femme enceinte sur 5 est séropositive et l'espérance de vie ne cesse de diminuer (3).

Au Mali, le premier cas de SIDA a été observé en 1985, dès lors une première enquête de séroprévalence a été menée en 1987. La prévalence était de 1% dans les capitales régionales, 40% dans le district de Bamako et chez les professionnelles de sexe des centres urbains (4). En 2001, le taux de séroprévalence dans la population générale était de 1,7% selon les résultats de la dernière Enquête Démographique de Santé (EDSM-III) dont 2% chez les femmes et 1,3% chez les hommes. La tranche d'âge la plus touchée est celle de 25-39 ans (2,1 à 3,4%) (4). Le nombre de cas de SIDA notifié cumulé à l'OMS était de 6639 et l'on estimait à 10500 le nombre de cas réels. A cette même année, l'épidémie de VIH/SIDA a occasionner au Mali la mort de 11000 personnes et a laissé 70000 orphelins (31).

Cependant, au-delà de ce taux de prévalence assez stable, il faut noter que d'avantage de Maliens risquent d'être infectés à cause de la forte prévalence dans certains groupes vulnérables (professionnelles de sexe,

routiers, coxeurs, vendeuses ambulantes, etc), de l'incidence des autres infections sexuellement transmissibles (IST) et de l'existence de certains comportements sexuels à risque. En 2000, une étude comportementale et de séroprévalence du VIH et des IST au sein de cinq groupes à haut et moyen risque a révélé des taux de prévalences suivantes : 29,7% chez les prostitués, 6,7% chez les vendeuses ambulantes, 4,1% chez les camionneurs et 1,7% chez les aides ménagères (4).

En l'absence de SIDA, l'espérance de vie à la naissance devrait passer de près de 50 ans en 1987 à 61 ans en 2010, mais du fait de l'infection elle pourrait se rabattre à 55 ans en 2010, soit un écart de 6 ans.

Il ressort des projections effectuées par le Bureau de Coordination du Programme National de Lutte contre le SIDA (PNLS) que le taux de prévalence du VIH dans la population générale pourrait atteindre 6% chez les adultes en 2010, en cas de non maîtrise de l'épidémie, soit près de 500000 cas ; ceci entraînera une occupation du quart des lits d'hôpitaux du pays (31). Une telle évolution aura des conséquences graves pour l'avenir du pays si des interventions efficaces ne sont pas entreprises pour enrayer ce fléau.

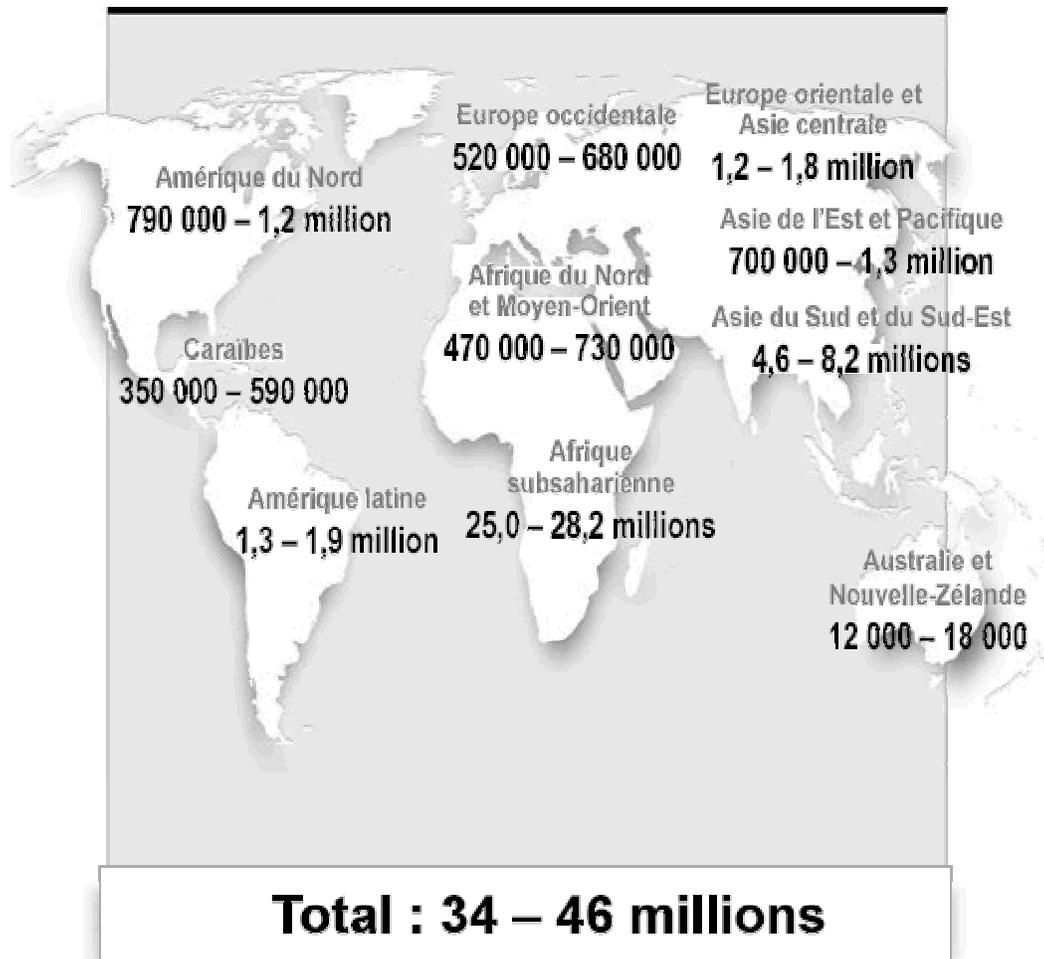


figure 5: Nombre de personnes vivant avec le VIH/SIDA dans le monde (ONUSIDA 2003, Réf : N° 3).

1-5-2. Répartitions géographiques des sous-types VIH-1 :

L'épidémiologie moléculaire du VIH-1 montre une distribution très hétérogène (voir tableau I).

Le sous-type B est largement dominant en Europe, en Australie, en Amérique du Nord, et du Sud où l'on retrouve un recombinant B/F (Brésil, Argentine) **(18)**.

En Asie, les sous-types B, C et E sont les plus retrouvés **(25)** avec une grande fréquence de virus recombinant dans les pays comme la Thaïlande (A/E), la Chine (B/C) **(32)**. Aussi en Russie, la circulation de sous-types A, B parmi les toxicomanes à Kaliningrad à entraîner l'émergence d'un hybride A/B **(33)**.

Une grande variabilité est observée dans le continent africain, plus particulièrement à l'intérieur du sous-type A **(24)**.

En Afrique de l'ouest le sous-type A est prédominant mais tous les autres sous-types sont aussi présents. En Afrique de l'Est, dans la région des grands lacs, les sous-types A, D sont les plus fréquents. Le sous-type C est retrouvé en Afrique du sud et en Ethiopie. La plus importante hétérogénéité génétique est retrouvée dans les pays d'Afrique centrale, le sous-type A est le plus représenté même si tous les autres sous-types ont été rapportés.

Au Mali, les sous-types A et G sont les plus fréquemment rencontrés chez les professionnels de sexe **(34)**. On retrouve également un CRF nommé CRF06-cpx **(35)** précédemment appelé 95 ML849 **(36)**, qui implique quatre différents sous-types A, G, K et J. Bien que sa prévalence exacte n'est pas connue, CRF06-cpx circule aussi au Sénégal, Burkina Faso, Nigeria.

La pandémie SIDA est donc due au VIH-1 rattaché au groupe M. Le sous-type B est responsable de l'épidémie dans les pays industrialisés. Une très grande hétérogénéité est constatée en Afrique.

TABLEAU I: REPARTITION SIMPLIFIEE DES SOUS-TYPES HIV-1 GROUPE M DANS LE MONDE (24).

Sous-type	Répartition majoritaire
A	Très fréquent en Afrique, grande variabilité
B	Europe, Amérique du Nord, Australie, variants au Brésil et en Thaïlande
C	Afrique, Australie, Ethiopie, Inde
D	Proche du B ; Afrique australe
E ou A/E	Asie du sud-est, Afrique
F	Roumanie, Brésil
G	Europe de l'Est, Afrique
H	Rare
I ou A/G/I	Chypre, Grèce
J	République démocratique du Congo (RDC)

(Source : F.Brun 1999, Réf : N°24)

1-5-3. Modes de Transmission :

Le VIH est présent dans la plupart des liquides biologiques (sang, salive, liquide-céphalo-rachidien (LCR), sperme, sécrétions vaginales, lait) (20). Trois principaux modes de transmission sont actuellement responsables de l'extension de l'épidémie:

- La transmission par voie sexuelle.
- La transmission verticale (de la mère à l'enfant).
- La transmission par voie sanguine.

1-5-3-1. Transmission sexuelle :

La voie sexuelle est le mode de transmission prédominant du VIH. Elle peut être Hétérosexuelle ou Homosexuelle. Environ 90% des personnes contaminées l'ont été par contact sexuel (31). Le mode de transmission hétérosexuelle est le principal en Afrique alors que dans les pays les plus avancés la grande majorité des sujets infectés par cette voie sont homosexuels (18).

1-5-3-2. Transmission verticale:

La transmission du virus de la mère à l'enfant peut survenir à des stades différents : *in utero* dans les semaines précédant l'accouchement (1/3 de cas), au moment de l'accouchement (majoritaire : 2/3 des cas), ou pendant l'allaitement (cas isolés).

1-5-3-3. Transmission parentérale :

Le VIH étant un agent hématogène, il peut être transmis lors des transfusions sanguines avec du sang infecté, les partages de

seringues surtout chez les toxicomanes, les tatouages, les scarifications, les circoncisions ou excision avec du matériel souillé, et les transplantations d'organes et de tissus. Cette voie de transmission reste faible par rapport aux deux précédentes du fait du contrôle systématique dans certains pays. Les drépanocytaires, les hémophiles restent des sujets à risque à cause des transfusions sanguines répétées.

1-6- POUVOIR PATHOGENE DU VIH :

1-6-1. Définition et classification:

La première définition de l'infection a été établie par le CDC en 1982 sur la base des manifestations observées chez les premiers cas de SIDA (37). Une deuxième définition fut élaborée après l'isolement du virus en 1983 et la mise au point d'une sérologie fiable (38). Pour harmoniser ces définitions dans le contexte des pays en voie de développement (PVD) notamment les pays africains, une définition clinique fut élaborée à leur intention en 1986 : C'est la définition de Bangui (39). En 1988, la nécessité d'avoir une seule définition amena l'OMS et le CDC à amender celles déjà existants et à proposer une troisième définition (40).

A coté de ces définitions très pratiques pour la surveillance épidémiologique, il existe d'autres classifications qui repartissent les malades dans des groupes homogènes en rapport avec les symptômes ; Ce sont :

- la classification du Walter reed institute (WRAIR) (41) ;
- la classification du CDC (1986) qui reparti les patients en quatre groupes s'excluant mutuellement (42) (Tableau II), sa révision en 1993 distingue trois catégories cliniques (43) (Tableau III) ;
- la classification OMS (1990) qui essaye de grouper les malades en quatre stades cliniques de gravité croissante.

TABLEAU II: CLASSIFICATION DES MANIFESTATIONS DE L'INFECTION A VIH/SIDA CDC 1986 (42).

Classification CDC 1986	
CDC I:	Infection aiguë
CDC II:	Infection asymptomatique
CDC III:	Lymphadénopathie généralisée persistante
CDCIV:	Autres pathologies.
	CDC IV A : Signes généraux
	CDC IV B à E : Pathologies opportunistes

TABLEAU III: CLASSIFICATION DES DIFFERENTS STADES DE L'INFECTION A VIH/SIDA, REVISION 1993 DU CDC (1986) (43).

Catégories cliniques	Nombre de lymphocytes CD4+		
	> 500/mm ³	200-499/mm ³	<200/mm ³
(A) Asymptomatique, primo-infection, lymphadenopathie	A1	A2	A3
(B) Symptomatique, Sans critères (A) ou (C)	B1	B2	B3
(C) SIDA	C1	C2	C3

1-6-2. Pathogénèse de l'infection humaine :

L'infection par le VIH se caractérise par un déficit immunitaire tant quantitatif que qualitatif de l'immunité cellulaire, plus particulièrement des lymphocytes T CD4+. Le mécanisme de destruction de ces cellules n'est pas parfaitement connu mais on peut l'expliquer par : **(18)**

- la lyse directe des cellules infectées par un effet cytopathogène ;
- la lyse par les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (CTL) des Lymphocytes T CD4+ non infectés mais porteurs passifs à leur surface de glycoprotéine d'enveloppe ;
- les phénomènes d'apoptose (mort cellulaire programmée) lors de la stimulation antigénique de cellules ayant été préalablement en contact avec des antigènes viraux ;
- l'anergie des cellules due à une hyperstimulation cellulaire.

1-6-3. Histoire naturelle de l'infection :

L'évolution de l'infection permet de distinguer trois stades **(19)**: la primo-infection, le stade asymptomatique et le SIDA.

1-6-3-1. Le stade de primo-infection :

C'est la phase de l'infection aiguë, elle survient en général 2 à 4 semaines après exposition au virus. Elle s'accompagne d'un pic de virémie, une diminution du nombre de lymphocytes CD4+ et une augmentation des CD8+. La diminution spontanée de la charge virale est due à la réponse immunitaire T spécifique **(18)**. A ce stade de l'infection, la présence du virus peut être mise en évidence par la détection de l'antigène p24 **(44)**. La recherche d'anticorps anti-VIH est souvent négative, mais le sujet est déjà infectant. La primo-

infection est le plus souvent inaperçue dans 50 à 90% des cas (45), ou se manifeste par des symptômes légers (syndrome pseudo-grippal, syndrome mononucléosique, etc) qui disparaissent rapidement et spontanément (46).

1-6-3-2. Le stade asymptomatique : (31)

C'est la phase chronique de durée variable dite de latence clinique, pouvant s'étendre sur plusieurs années (10 ans environ en l'absence de traitement).

La réplication virale montre une stabilité apparente alors qu'elle est particulièrement active dans les tissus lymphoïdes. Le sujet déjà contaminé ne présente pas de signes ressentis, visibles ou palpables, mais il reste infectant. A ce stade la virémie est faible et la personne est dite séropositive.

1-6-3-3. Le stade SIDA :

C'est la phase finale ou phase d'immunodépression allant de quelques mois à peu d'années. On observe une augmentation de la charge virale suivie de la chute du nombre de lymphocytes CD4+. Les manifestations cliniques apparaissent avec l'invasion de l'individu par les agents opportunistes.

Cependant l'Histoire naturelle de l'infection peut varier d'un individu à un autre ; en effet 5% des personnes infectées sont des asymptomatiques à long terme ou " Long Term non Progressors" avec une préservation relative de l'immunité adaptative à médiation cellulaire ; les autres (5-10%) sont des progressseurs rapides. De nombreuses études ont tenté d'identifier les facteurs de risque de progression de la maladie et deux facteurs ont été distingués (18); les facteurs liés à l'hôte, et ceux liés au virus.

- Les facteurs génétiques et immunologiques de l'hôte, on peut citer entre autre :

- le polymorphisme génétique des co-recepteurs viraux ; la délétion de 32 pb au niveau de deux allèles du gène CCR5 rend inopérant ce corecepteur. Les individus homozygotes pour cette délétion constituent 1% de la population dite caucasienne et ont une résistance à l'infection alors que l'évolution serait ralentie chez les hétérozygotes (15-20% des caucasiens) (47). De même, la substitution d'AA en position 64 au niveau du gène CCR2 provoquerait un ralentissement de la maladie de 2-4 ans (48). Cependant ces mutations ne peuvent à elles seules résoudre la question de susceptibilité-résistance au VIH car il y a des sujets hautement exposés et non porteurs de délétion qui semblent être réfractaire à l'infection ;
- certains haplotypes HLA de classe I ;
- la qualité et la persistance de la réponse cellulaire ;
- le taux de β -chémokines sécrétés.

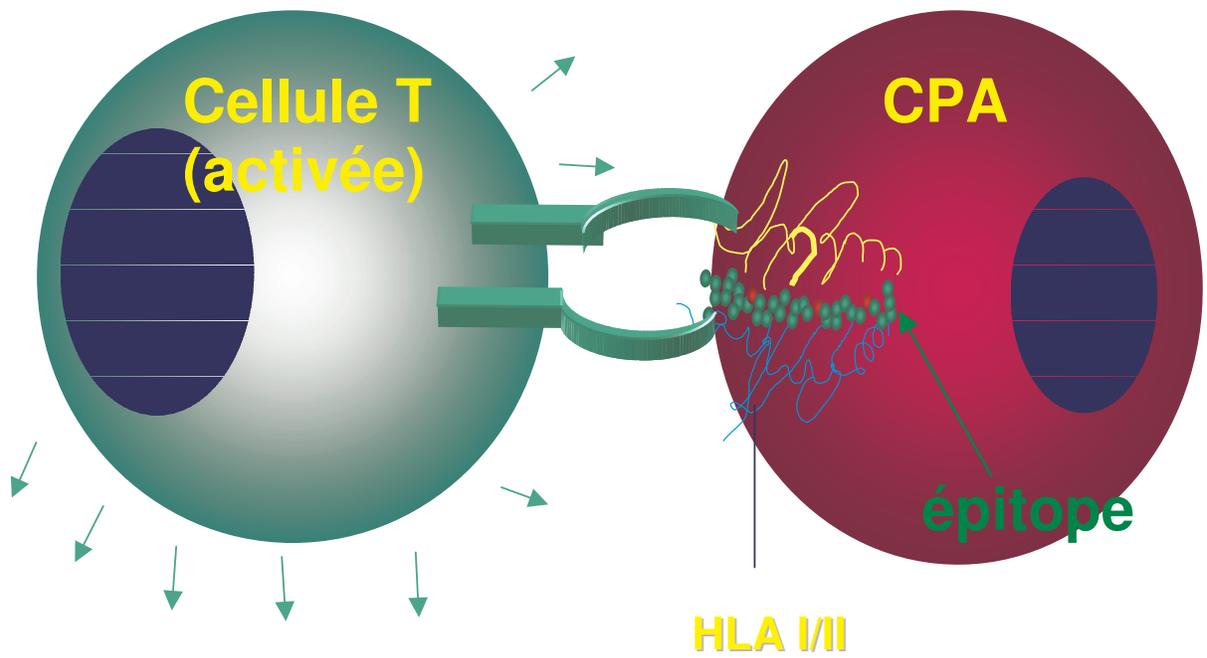
- Les facteurs viraux sont : Le tropisme, la taille de l'innoculum, l'ampleur de la réplication virale lors de la primo-infection, souches virales atténuées du fait de la délétion de certains gènes.

1-6-4. Défense de l'hôte contre le VIH : (Effet d'IFN- γ sur la réponse immunitaire cellulaire)

L'IFN- γ est un facteur soluble appartenant à la grande famille des cytokines. Il est sécrété par les lymphocytes T activés notamment les lymphocytes T auxiliaires (Th1) en réponse à une stimulation antigénique (voir figure 6). C'est un inhibiteur de la réplication virale *in vitro*. Il confère un état de résistance à l'infection en ralentissant la progression de la maladie :

- par l'activation des antigènes HLA à la surface des cellules d'où une augmentation de la présentation antigénique,
- par l'activation des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (CTL).
- par l'Induction d'une réponse Th1 vis à vis du virus.

Le taux d'IFN- γ produit par les Th1 est inversement corrélé à la réplication virale et constitue aujourd'hui l'un des meilleurs indicateurs d'une réponse immune efficace (2)



Légende:

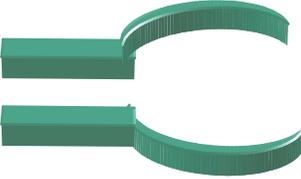
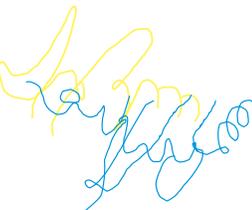
- TCR (T cells Receptor): 
- Libération d'INF- γ : 
- Antigène HLA de Classe I/II: 

figure 6: Induction de la libération d'INF- γ après activation des cellules T par un épitope.

1-7. METHODES DE DIAGNOSTIC :

Depuis son identification en 1981, des efforts ne cessent d'être fait pour améliorer les qualités du diagnostic. Les méthodes utilisées sont diverses selon l'objectif recherché et nécessitent d'être réadaptée si besoin pour couvrir les nouveaux variants du virus. On distingue les méthodes directes et indirectes.

1-7-1. Les méthodes de diagnostic indirect:

Ce sont des techniques sérologiques basées sur la détection d'anticorps chez le sujet infecté. Elles sont nombreuses avec une sensibilité et une spécificité variable mais reste la démarche diagnostique la plus accessible (17,18).

1-7-1-1. La technique d'agglutination : (20)

Elle consiste à coupler artificiellement l'antigène viral à un support particulaire (particules de latex). La présence d'anticorps dans le sérum se traduit par une agglutination des particules visible à l'œil nu. Cette méthode est moins sensible que l'ELISA mais de réalisation très rapide (moins de 30 minutes) ne nécessitant aucun appareillage. C'est cette approche qui est utilisée dans la conception de tests rapides qui constituent un excellent recours en cas d'urgence notamment dans les PVD.

1-7-1-2. Techniques utilisant un anticorps secondaire marqué :

L'antigène viral est immobilisé sur un support solide (lame de verre, microplaque ou tube en plastique), le sérum à tester est mis en contact avec l'antigène viral. Après une étape de lavage

minutieux, un anticorps anti-immunoglobuline humaine est ajouté ; cet anticorps appelé conjugué, est couplé à un système de révélation qui définit la technique utilisée. Trois méthodes sont utilisées en sérologie VIH (voir tableau IV) :

- L' immunofluorescence indirect (IFI)
- La radio-immunoprécipitation (RIPA)
- Les techniques immunoenzymatiques tel que l'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

TABLEAU IV: LES TECHNIQUES UTILISANT UN DEUXIEME ANTICORPS MARQUE (20).

Technique	IFI	RIPA	ELISA
Système de révélation et de lecture	Lumière Ultraviolette (UV)	Compteur de radioactivité	Spectrophotomètre
Marqueur	Fluorochrome	Radio-isotope	Enzyme
Support	Lame de verre	Plastique	Microplaque

Parmi ces techniques, l'ELISA est la plus utilisée pour la recherche d'anticorps anti-VIH. Elle est encore appelée HIV enzyme immunoassay (EIA), et repose sur des concepts différents : test sandwich, test compétition.

1-7-1-2-1. Principe de la technique ELISA sandwich : (17, 20)

Le sérum à étudier est mis en incubation dans le support sensibilisé (microplaque, bille). Des complexes immuns se forment

et leur présence est révélée par l'addition d'un sérum antiglobuline humaine marqué par une enzyme.

Après lavage, le substrat de cette dernière donne une réaction colorée d'autant plus intense que le sérum est riche en anticorps. La comparaison de la densité optique (DO) des contrôles négatifs et positifs avec celui de l'échantillon permet d'affirmer la sérologie.

1-7-1-2-2. Avantage :

C'est une méthode rapide, simple, permettant l'analyse de grandes séries d'échantillons. Les réactifs disponibles sont constitués soit de protéines natives, soit de protéines recombinantes, soit de peptides synthétiques. Actuellement les troussees utilisées dépistent à la fois le VIH-1 et le VIH-2.

1-7-1-2-3. Inconvénient :

L'ELISA a spécificité est limitée, des réactions faussement négatives peuvent se produire pendant la fenêtre sérologique (avant séroconversion) (49). Il est aussi possible que des individus séronégatifs aient des anticorps qui peuvent réagir. Ce phénomène est observé spécialement chez les femmes multipares, elles possèdent des anticorps dirigés contre les antigènes HLA (d'où des réactions faussement positives). C'est pourquoi L'ELISA n'est pas un test de confirmation. Un résultat sérologique positif ne doit être rendu ou communiqué au patient sans confirmation par la méthode Western blot (WB) ou la RIPA, ou un autre test ELISA.

1-7-1-3. Western blot : (17, 20)

C'est une technique immuno-électrophorétique qui permet l'identification des différents anticorps dirigés contre les protéines

structurales. Il est actuellement le test de confirmation de choix pour détecter la séroposivité au VIH-1 chez les individus infectés.

Ces protéines sont :

- les glycoprotéines de l'enveloppe (Env) : gp160, gp120 et gp41. Elles sont les plus importantes pour le diagnostic ;
- les protéines du core (Gag), il s'agit du précurseur p55 et les protéines matures p24, p17 ;
- Les protéines Pol, correspondant aux enzymes virales : sont représentés principalement par p66 et p31.

1-7-1-3-1. Principe :

Elle consiste schématiquement en un test d'immuno-précipitation sur support solide, permettant de visualiser les anticorps spécifiques dirigés contre les protéines des trois grands gènes, *gag*, *pol* et *env*.

Les protéines virales sont extraites, purifiées puis séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Elles sont issues soit de virus purifiés et dissociés (lysats viraux), soit de antigènes recombinants. Les antigènes viraux sont ensuite transférés sur des bandelettes de nitrocellulose. Le sérum à tester est mis en incubation en présence de ces bandelettes. Les anticorps présents se fixent en fonction de leur spécificité sur les protéines virales préalablement séparées. Puis ils seront pris en sandwich par un conjugué marqué par une enzyme et révélaté par un substrat chromogène. Pour l'interprétation l'Organisation Mondiale de la Santé recommande pour affirmer la séroposivité:

- la présence au minimum d'anticorps dirigés contre les produits de deux gènes incluant obligatoirement le gène *env* donc soit anti-*env* plus anti-*gag* ou anti-*env* plus anti-*pol* ;
- la présence éventuelle d'anticorps dirigés contre seulement deux protéines d'enveloppe.

1-7-1-3-2. Avantages :

Cette méthode sérologique est applicable dans la recherche et dans le diagnostic de routine. Elle est spécialement sensible pour détecter les anticorps Anti-p24. Elle permet également de soupçonner, voire de confirmer, des cas de primo-infections sur la base de profils incomplets.

1-7-1-3-3. Inconvénients :

La technique ne peut pas détecter les anticorps dirigés contre les gènes régulateurs tel que *nef*. Il existe des situations où une franche séropositivité n'est pas observée, ces cas sont nommés Western Blot indéterminé.

1-7-2. Les techniques de diagnostic direct :

Elles permettent la détection directe du virus dans le prélèvement.

On distingue :

1-7-2-1. Test de détection de l'antigène p24 : (18)

L'intérêt actuel de ce test réside dans le diagnostic de la primo-infection durant la période où les anticorps sont indétectables. Il consiste en une technique ELISA d'immunocapture où l'anticorps anti-p24 fixé à la phase solide capte l'antigène libre présent dans le sérum. La positivité doit être confirmée par un test de

neutralisation spécifique pour exclure d'éventuels faux positifs. Un traitement à l'acide ou à la chaleur sera effectué lorsque p24 se trouve sous forme complexée avec l'anti-p24. L'antigénémie p24 constitue un marqueur direct de l'infection à VIH, elle est détectable si la viremie est de l'ordre de 10^4 copies d'ARN viral/ml de plasma.

1-7-2-2. L'isolement du virus dans les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs): (6, 20)

La technique consiste en l'isolement des PBMCs sur gradient de densité, suivi d'une co-culture des cellules du patient avec des donneurs séronégatifs stimulées à la phytohémagglutinine A (PHA) et maintenues dans un milieu de culture contenant IL-2. La présence du virus est détectée par la recherche de l'antigénémie p24 et ou de l'activité Transcriptase inverse dans les surnageant de culture.

1-7-2-2-1. Avantages :

Ce test permet d'étudier la diversité des souches notamment la caractérisation de virus atypique, la résistance aux ARV.

1-7-2-2-2. Inconvénients :

Il s'agit d'une technique longue et coûteuse qui ne peut s'effectuer que dans les laboratoires spécialisés avec des conditions de sécurité requises.

1-7-2-3. Le diagnostic moléculaire :

La virologie moléculaire a pris une place de choix dans l'arsenal des méthodes de diagnostic direct de l'infection à VIH.

1-7-2-3-1. Recherche qualitative par amplification génique (PCR= Polymerase Chain Reaction) :

La PCR est une méthode d'amplification génique *in vitro* particulièrement sensible permettant de mettre en évidence des quantités très faibles de séquences nucléotidiques dans un prélèvement biologique. Elle a été mise au point par Kary Mullis en 1985 (50) et consiste à amplifier des séquences virales conservées à l'aide d'oligonucléotides de synthèse (Amorce) et d'une polymérase thermostable active à 72°C (dont le prototype est la Taq polymérase dérivée d'une bactérie marine, *Thermophilus aquaticus*) (51). Ces régions seront localisées préférentiellement dans les gènes les plus conservés à savoir *gag*, *pol*, *env*, voire dans les LTRs.

La séquence cible peut être soit une région intégrée (ADN proviral) soit de l'ARN viral après rétrotranscription.

La PCR comporte plusieurs cycles d'amplification exponentielle ou chaque cycle se décompose en trois temps: la dénaturation de l'ADN par la chaleur à 95°C ; l'hybridation avec une paire d'amorce encadrant la région à amplifier et l'élongation rapide.

La réaction s'effectue dans une plaque chauffante programmable ou thermocycleur permettant des changements très rapides de températures. Au terme de la réaction, le fragment amplifié peut être visualisé par électrophorèse sur gel (sa taille est déterminée par la position des amorces) ou être détecté à l'aide d'une sonde marquée (amplification du signal) (19).

a- Application de la PCR à la recherche sur le SIDA : (6)

Cette technique est beaucoup utilisée dans la recherche sur le SIDA pour

- l'identification de l'infection latente chez les individus séronégatifs;
- la résolution du statut sérologique de l'enfant (les anticorps maternels, peuvent persister chez le nouveau-née jusqu'à 15 mois) ;
- la résolution du WB indéterminé lors d'une infection à VIH-2, d'une séroconversion en cours ou lors des croisements antigéniques avec des protéines virales ou parasitaires (absence de la protéine d'enveloppe), fréquents en Afrique sans conséquences pathologiques connues ;
- la quantification de la charge virale (la connaissance de la masse génomique indique l'évolution de la maladie chez un patient qui suit un traitement antirétroviral) ;
- l'évaluation de l'hétérogénéité virale.

b- Limites des techniques d'amplification :

- Les résultats faussement positifs, dus à des contaminations par des traces d'ADN cible. Elle nécessite la mise en œuvre d'importantes précautions de manipulation.
- Les résultats faussement négatifs liés à la présence de substances inhibitrices dans le prélèvement, ce qui impose d'être très attentif aux techniques d'extraction du matériel génétique avant l'amplification.

1-7-2-3-2. Détermination de la charge virale :

Au départ la détermination de la charge virale a été mise en évidence par des approches de virologie classique (quantification de virus infectieux ou

quantification du nombre de cellules infectées) ; cependant ce sont les techniques de biologie moléculaire qui l'ont rendue accessible. Il a été clairement montré que le taux d'ARN plasmatique était étroitement corrélé au titre infectieux du plasma, ce qui justifie sa généralisation ; ainsi la variation de la charge virale n'est significative que si elle atteint un facteur 3 en expression arithmétique ou 0,5 en logarithme.

Des trousse commerciales sont actuellement disponibles mais aucun de ces tests commerciaux ne permet la quantification du VIH-2 (**18**). On distingue trousse NASBA QR system® (Organon Teknica), la trousse Amplicor HIV-1 Monitor® (Roche diagnostic System®) et la trousse HIV-1 RNA 3.0 de Bayer®.

- Le test NASBA QR system® (Organon Teknica) : elle repose sur l'amplification cyclique du génome viral. Le seuil est de 80 copies/ml.
- La trousse Amplicor HIV-1 Monitor® (Roche diagnostic System®) : elle regroupe quatre techniques : la rétrotranscription *in vitro* de l'ARN viral pour générer le cDNA, amplification génique (PCR) dans le gène *gag* du cDNA, hybridation de l'amplicon à l'aide de sondes moléculaires, détection du complexe sonde-amplicon par réaction colorimétrique. Le seuil de la technique est de 400-750 copies/ml ou de 50-75 copies/ml dans sa version ultrasensible.
- La trousse HIV-1 RNA 3.0 de Bayer® (Technique de l'ADN branché : bDNA) (**52, 18**) : Elle repose sur le principe de l'hybridation moléculaire en sandwich de l'ARN viral *in vitro* avec des sondes oligonucléotidiques. Ces sondes se fixent sur différentes régions hautement conservées du génome (gène *pol*). L'amplification de signaux lumineux produits par cette

hybridation sera quantifiée à l'aide du système 340 Bayer bDNA Bayer® de dans le plasma des sujets d'études. L'émission des signaux lumineux est proportionnelle à la charge virale du VIH-1 dans chaque échantillon. Les résultats sont enregistrés en unités relatives de lumière (RLU) et comparés à ceux des étalons contenant des concentrations connues de virus inactivés à la bêta-propiolactone (BLP). Le seuil de détection de la technique est de 50 copies/ml.

Ce test peut se faire en trois étapes: préparation des concentrés viraux, hybridation des sondes, mesure des signaux. Cinq types de sondes sont utilisés : Sondes de capture, sonde Pré-amplificatrice, sondes amplificatrices, sondes cibles, sondes de marquage.

1-8. METHODES D'EVALUATION DE LA REPONSE T :

Aujourd'hui plusieurs techniques sont utilisées pour évaluation quantitative et qualitative de la réponse à médiation cellulaire. Parmi celles ci figurent : Le test au chrome 51 (Cr51), le test de lymphoprolifération, l'ELISpot (Enzyme Linked Immunospot) (2).

1-8-1. Le test au Cr51 :

C'est un test de cytotoxicité qui permet de mesurer la quantité de Cr51 relarguée après la lyse cellules (PBMCs) dans le surnageant d'une co-culture. C'est le test de référence. L'inconvénient de cette technique est sa sensibilité, la lenteur d'obtention des lignées cellulaires et la nécessité de faire de nombreuses stimulations.

1-8-2. Le test de lymphoprolifération :

Il permet d'évaluer les réponses CD4+. Les cellules sont mises en culture en présence d'un antigène. Au 5^{ème} jour de la culture, la prolifération est évaluée par la quantification de l'incorporation de la thymidine tritiée dans les lymphocytes. Ce test est limité par sa sensibilité et sa reproductibilité.

1-8-3. Enzyme Linked Immunospot (ELISpot) :

L'ELISpot est un test immunoenzymatique qui permet d'évaluer *in vitro* la production d'IFN- γ par les lymphocytes T (CD4+ ou CD8+) après une brève stimulation avec des peptides antigéniques (53). Lorsque les cellules libèrent INF- γ , ce dernier sera pris en sandwich entre des anticorps spécifiques d'où la formation de spots ou "footprint". Ces spots sont détectés à l'aide d'une réaction colorimétrique (54). Le nombre de spots augmente proportionnellement avec l'ampleur de la réponse immunitaire. C'est une technique sensible qui regroupe trois méthodes: la prolifération

lymphocytaire, l'ELISA sandwich sur microplaque et une technique de comptage des spots. Actuellement l'ELISpot est beaucoup utilisé pour explorer les fonctions immunitaires. Les tests sont faits en triplicate pour tenir compte de la variabilité de la technique.

1-9. MOLECULES ANTIRETROVIRALES:

La chimiothérapie anti-virale a fait d'énormes progrès au cours des dernières années et, depuis la mise au point de la première molécule anti-VIH disponible en 1986 : l'AZT (**55**), le nombre des ARV n'a cessé de s'accroître. Aujourd'hui on dispose de quatre familles de médicaments : (**19**)

- Les inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI)
 - Abacavir, ABC(Ziagen ®)
 - Didanosine, ddl (Videx ®)
 - Lamivudine, 3TC (Epivir ®)
 - Stavudine, d4T (Zerit ®)
 - Ténofovir, TDF (Viread ®)
 - Zalcitabine, ddC (Hivid ®)
 - Zidovudine, AZT(Retrovir ®)

- Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI)
 - Délavirdine (Rescriptor ®)
 - Efavirenz (Sustiva ®, Stocrine®)
 - Nevirapine (Viramune®)

- Les inhibiteurs de la protéase (IP)
 - Amprénavir (Agenerase ®)
 - Indinavir (Crixivan ®)
 - Lopinavir/ Ritonavir (Kaletra ®)
 - Nelfinavir (Viracept ®)

- Ritonavir (Norvir ®)
- Saquinavir (Invirase ®)
- Les inhibiteurs de fusion: La T20, enfuvirtide (Fuzéon®)

Malheureusement du fait de sa grande hétérogénéité génétique, le virus du SIDA est capable d'adapter son code génétique de manière à échapper de l'effet des ARV, c'est ce qu'on appelle RESISTANCE. Un virus peut ainsi devenir résistant à une ou plusieurs molécules à la fois : Résistance croisée. La résistance n'apparaît que lors de la réplication du virus et c'est pourquoi l'un des principaux objectifs du traitement étant de réduire la multiplication du virus le plus durablement possible en associant plusieurs molécules ARV. Le fait d'utiliser plusieurs médicaments agissant simultanément sur différents points d'attaque du virus est un moyen d'empêcher ou de retarder l'apparition de la chimiorésistance. Donc la monothérapie avec les molécules actuellement disponibles est désormais déconseillée, sauf en cas de transmission mère-enfant.

Au Mali, les ARV seront gratuits sous peu mais la pratique de prescription selon le protocole de l'IMAARV (Initiative Malienne d'Accès aux ARV) reste en première ligne : 2NRTI+ 1NNRTI. Auparavant l'association ddl+d4T +Crixivan (IDV) était la plus utilisée, mais maintenant la ligne AZT+ 3TC+ Strocine (EFZ) est la plus prescrit (56)

1-10. PREVENTION : (20)

En absence de vaccin efficace contre le VIH, des stratégies préventives collectives et individuelles sont nécessaires pour réduire le risque de contamination:

- prévention de la transmission sexuelle par la promotion de l'utilisation des préservatifs et par l'éducation et l'information ;
- prévention de la transmission mère-enfant par l'intervention thérapeutique en cours de grossesse, durant l'accouchement et le suivi de l'enfant pendant les six premières semaines de la vie ;
- dépistage systématique chez les donneurs de sang, de sperme, de tissus ou d'organes ;
- inactivation des dérivés plasmatiques (produits stables dérivés du sang)
- prévention de la transmission lors de l'échange de seringues chez les toxicomanes et lutte contre la toxicomanie ;
- prévention de la transmission aux personnels médicaux et para-médicaux reposant sur les mesures d'hygiène classiques (appliquées à toutes maladies infectieuses transmises par le sang ou tout autre liquide biologique.

1-11. RECHERCHE VACCINALE :

1-11-1. Situation actuelle :

Vingt ans après la découverte du VIH-1, les scientifiques ne disposent pas d'un modèle vaccinal anti-VIH capable d'induire une immunité stérilisante permettant à un stade précoce de l'infection d'éradiquer le virus.

Le premier essai vaccinal contre le VIH a été réalisé en 1987 aux USA. Depuis de nombreux candidat-vaccins sont à l'étude à travers le monde mais aucun n'a encore fait preuve d'une efficacité suffisante lui permettant de dépasser les essais cliniques de phase III. Ils sont basés sur des approches différentes: protéines virales, virus vivants atténués, virus tués ou inactivés, vaccin à ADN, peptides viraux, pseudovirions, vecteurs vaccinaux, replicons (57). On distingue trois générations de candidat-vaccins (les candidat-vaccins de première, deuxième, troisième génération) (58) :

- Candidat-vaccins de première génération, les antigènes candidats sont les protéines d'enveloppe tel que la gp120 capables d'induire la production d'anticorps neutralisants. C'est le cas bivalent AIDSVAX, Vax Gen, Inc. (B/B et B/E)
- Candidat-vaccins de deuxième génération sont conçus pour induire une immunité à médiation cellulaire. Ils sont basés sur des concepts différents: vecteurs vaccinaux (ALVAC, Aventis Pasteur) et ou des puces à ADN destinés à coder un ou plusieurs gènes du VIH (comme exemple il y a l' EUROVAC: B, B/C).
- Candidat-vaccins de troisième génération sont les plus récents, ils sont basés sur les protéines de régulation telles que Tat et Nef.

A ce jour, plus de 80 essais vaccinaux de phase I et II ont été réalisés (y compris 12 essais dans des PVD), mais seul AIDSVAX est passé à la phase III aux USA et en Thaïlande (59). Malheureusement les premiers résultats publiés sur 5009 volontaires à haut risque d'infection ont annoncé l'échec du modèle AIDSVAX B/B. Les caractéristiques principales de l'infection qui rendent difficile la conception d'un modèle vaccinal sont (2) :

- la diversité génétique du VIH-1 entraîne la nécessité d'élaborer un vaccin capable d'affronter cette variabilité et d'induire des anticorps neutralisants et des réponses cellulaires CD4/CD8 capables de protéger les vaccinés contre les souches circulantes.
- le polymorphisme du système HLA complique la conception d'un candidat-vaccin induisant une réponse cellulaire (CTL) protectrice. La restriction au système HLA fait que les épitopes varient selon l'haplotype HLA des individus censés recevoir le vaccin anti-VIH. De plus l'infection s'accompagne de l'inhibition des molécules HLA à la surface des cellules infectées, les rendant ainsi invisibles aux CTL.
- la voie de contamination majeure est trans-muqueuse alors que peu de choses sont connues sur l'immunité muqueuse pour obtenir une immunité locale efficace.
- La difficulté d'induire une réponse humorale en utilisant des anticorps anti-VIH1 neutralisants dirigés contre les régions les plus conservées de l'enveloppe virale.

Cependant force est de reconnaître que tous ces vaccins en phase d'étude sont focalisés à priori sur les souches qui circulent dans les pays développés (notamment le sous-type B) alors qu'il y a une divergence énorme avec les

isolats rencontrés dans les PVD (sous-type non B) ou le SIDA est plus prévalent.

Donc un vaccin contre le SIDA doit inclure les régions les plus conservées et les plus immunogènes du génome viral et également être accessible par son coût à toutes les couches sociales du monde. C'est cette approche qu'on est entrain de réaliser au Mali en collaboration avec Dr DeGroot de Brown University, la fondation GAIA. Les étapes de cette recherche seront: **(60)**

- l'identification des épitopes;
- la conception d'un vaccin à base d'ADN incluant les épitopes;
- la conception d'un vaccin de rappel incluant les épitopes;
- la réalisation des tests in vitro et sur les souris du vaccin à base d'ADN;
- la réalisation des tests d'innocuité;
- la réalisation des premiers essais de phase I

Pour un départ la stratégie consiste à identifier par des outils de bioinformatiques les épitopes hautement conservées du VIH-1, qui peuvent se fixer sur les molécules HLA et induire la libération d'IFN- γ . La réponse immunitaire cellulaire (CD4+, CD8+) sera alors facile à évaluer à l'aide de tests immunologiques tel que l'ELISpot. Ceci pourrait accélérer la conception d'un vaccin mondiale contre toutes les formes du virus.

METHODOLOGIE

2- MATERIELS ET METHODES :

2-1. LIEUX D'ETUDE :

L'étude a été effectuée au Centre National de Transfusion Sanguine (CNTS) et au Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée (LBMA) à la Faculté des Sciences et Techniques (FAST) dans le District de Bamako. Au CNTS nous avons sélectionné nos sujets. Les techniques de laboratoire ont été faites au LBMA.

2-1-2. Le Centre National de Transfusion Sanguine de Bamako (CNTS) :

Il est situé en commune II du district de Bamako dans le quartier de Quinzambougou au centre ville non loin du commissariat du 3ème arrondissement.

2-1-2-1. Le personnel :

Le CNTS est dirigé par :

- un directeur, spécialiste en immuno-hématologie et en transfusion sanguine.

Il est chargé de la coordination de toutes les activités du centre ;

- trois médecins généralistes dont un responsable du laboratoire et deux autres chargés de la collecte de sang ;

- dix techniciens diplômés d'Etat, chargés des analyses biologiques ;

- un comptable, deux gestionnaires et deux secrétaires de direction.

2-1-2-2. Le local :

Le CNTS est composé de deux bâtiments reliés par un passage couvert. Le bâtiment sud abrite la cuisine et la salle de collation des donneurs de sang ; le bâtiment nord comprend trois parties : une partie administrative, une partie

réservée à l'accueil, à l'entretien avec le donneurs, la salle de garde et la préparation des produits sanguins et un partie destinée aux laboratoires de validation biologique des produits sanguins et leur conservation.

2-1-3. Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée (LBMA):

Le LBMA est situé sur la colline de Badalabougou en commune V du district de Bamako, au sein de la FAST de l'Université de Bamako.

2-1-3-1. Le personnel:

Le LBMA comprend plusieurs unités : l'unité de Parasitologie, l'unité de Virologie et l'unité de Biotechnologie végétale. Le laboratoire est sous la responsabilité d'un spécialiste en parasitologie moléculaire, il est le chercheur principal et supervise toutes les activités menées dans le laboratoire. Il est assisté par :

- des pharmaciens biologistes responsables des différentes unités et de l'encadrement des travaux pratiques pour les étudiants de la FAST et des thésards de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie (FMPOS) ;
- des techniciens diplômés d'Etat, chargés des analyses biologiques ;
- une secrétaire de direction.

2-1-3-2. Le local:

Le LBMA est composé de trois bâtiments :

- un bâtiment au sud abritant la salle de biotechnologie, la salle de culture cellulaire et la salle de génomique fonctionnelle.
- Deux bâtiments au nord, le premier est destiné à la parasitologie et la biologie clinique, le second pour la virologie.

2-2. TYPE ET PERIODE D'ETUDE :

L'étude était prospective, elle s'est déroulée pendant 9 mois entre Août 2003 et Avril 2004.

2-3. POPULATION D'ETUDE :

L'étude a porté sur des donateurs volontaires de sang confirmés séropositifs au VIH et dont le sang a été prélevé pendant la matinée au CNTS. Ces poches de sang ont été prises après signature de la fiche de consentement éclairé par le donneur (voir Annexe). De plus, des sujets tirés au sort séronégatifs au VIH mais séropositifs pour l'Hépatite B (VHB) ou Hépatite C (VHC) ont été inclus dans l'étude comme témoin. Nous avons travaillé sur 35 donateurs répartis en deux groupes :

- groupe VIH+, constitués de 30 donateurs séropositifs pour le VIH et séronégatifs pour VHB et VHC;
- groupe VIH- , constitués de 5 donateurs séropositifs pour le VHB ou séropositifs pour le VHC, mais séronégatifs pour le VIH.

2-3-1. Critère d'inclusion :

Ont été inclus dans cette étude, les donateurs de sang volontaires consentant appartenant à un des deux groupes et dont la durée de conservation du prélèvement sanguin n'avait pas dépassé 6 heures.

2-3-2. Critères de non-inclusion:

N'ont pas été inclus dans notre étude :

- les donateurs de sang volontaires n'appartenant à aucun des deux groupes
- les donateurs de sang volontaires séropositifs au VIH dont la poche de sang a été conservée pendant plus de 6 heures.

- les donneurs de sang appartenant à un des deux groupes mais non consentant.
- les donneurs de sang pour parents malades (donneurs familiaux) séropositifs au VIH.

2-4- PREPARATION DES ECHANTILLONS AU CNTS :

Le prélèvement était effectué au pli du coude après désinfection correcte de la peau chez chaque patient. Le sang était recueilli dans des poches stériles contenant du citrate de sodium. Après la détection de la séropositivité par l'ELISA; une personne qualifiée du CNTS transportait la poche dans un sac thermostable pour agent infectieux (Timber Creek TM) le même jour au LBMA pour notre étude.

2-5. ETABLISSEMENT DE LA CARTE DES EPITOPES PAR LES OUTILS DE BIOINFORMATIQUE :

Les épitopes ont été conçus à partir des séquences des souches virales disponibles au niveau GenBank à partir du 31 Décembre 1997 par la compagnie EpiVax, Inc., en collaboration avec le laboratoire de VIH/Tuberculose de Brown University (Providence, RI, USA) et la fondation GAIA .

Conservatrix est un logiciel de recherche d'homologie, qui permet de comparer les séquences protéiques les plus conservées entre différents organismes vivants ou à l'intérieur d'une même espèce. Il peut comparer la séquence de chaque dizaine d'acides aminés d'un peptide parmi les séquences au niveau de la banque de données. *Conservatrix* a été utilisé pour identifier des épitopes largement conservés parmi plus de 65000 isolats

représentant 8 sous-types du VIH-1 (A, B, C, D, E, F, G, H). Le programme a été configuré pour la recherche de peptides basée sur une conservation absolue (ni substitution d'acide aminé à quelque position que ce soit).

EpiMatrix est un algorithme de recherche qui permet d'évaluer l'immunogénicité des épitopes et estimer le score de fixation aux molécules de classe I et II du HLA.

Les critères de sélection des épitopes étaient les suivants (61):

- une conservation maximale (supérieure à 10% chez tous les isolats) et une immunogénicité prédictive, les mille peptides les plus conservés ont été obtenus à l'aide du logiciel *Conservatrix* à travers GenBank, base de données de 1997. L'immunogénicité a été évaluée par *EpiMatrix*, et la classification par le score a été faite par *EpiMatrix* score ;
- une représentation proportionnelle parmi les protéines de VIH-1, le nombre de peptides sélectionnés était proportionnel à la longueur totale de chacune des 9 protéines du VIH-1 ;
- une promiscuité attendue, en tenant compte de la probabilité qu'un seul peptide pourrait être restreint par plusieurs haplotypes HLA ;
- le choix du score le plus élevé, 100 peptides soit 25 peptides pour 4 allèles de classe I du HLA (A2, A3, A11 et B7) et plusieurs peptides de classe II ont été identifiés. Trente peptides dont 10 de classe I et 20 de classe II ont été choisis pour être testés dans notre étude.

2-5-1. Synthèse des peptides :

Les peptides sélectionnés pour notre étude ont été préparés en présence du 9-fluoronylmethoxy-carbonyl (Fmoc) dans un automate dénommé : Rainen

Symphony/ Protein Technology Synthesizer (Synpep, Dublin, CA) avec une pureté de 95% par chromatographie liquide haute performance (HPLC).

2-5-2. Epitopes CD8+ (Classe I) :

Parmi les 100 peptides identifiés, les peptides A3 conçus à partir de 7 protéines virales se sont révélés plus fréquemment positifs à l'ELISpot (61). C'est ainsi que notre étude a porté sur 10 peptides de la classe I de l'allèle A3. (Tableau V).

TABLEAU V: LISTE DES EPITOPES DE CLASSE I

Epitopes	Séquences
HIV_VAX_A3_ENV_1064	ELYKYVVK
HIV_VAX_A3_ENV_1065	TVQCTHGIR
HIV_VAX_A3_GAG_1068	ATLYCVHQQ
HIV_VAX_A3_POL_1074	KLAGRWPVK
HIV_VAX_A3_POL_1075	FVNTPLLVK
HIV_VAX_A3_POL_1077	IIATDIQTK
HIV_VAX_A3_TAT_1079	KALGISYGRK
HIV_VAX_A3_VIF_1080	LVKHHMYVSK
HIV_VAX_A3_VPU_1082	SIVFIEYRK
HIV_VAX_A3_REV_1042	AIFQSSMTK

2-5-3. Les épitopes CD4+ de classe II:

Vingt peptides de classe II identifiés à partir des 9 protéines virales par les différents logiciels ont été utilisés au cours de notre étude (Tableau VI) .

TABLEAU VI: LISTE DES EPITOPES DE CLASSE II

Epitopes	Séquences
HIV_VAX_ClassII_GAG_1043	ILGLNKIVRMYSILDIRQGP
HIV_VAX_ClassII_GAG_1044	VGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPV
HIV_VAX_ClassII_GAG_1045	PQDLNMMLNIVGGHQAAMQMLKD
HIV_VAX_ClassII_POL_1046	TVLVGPTPVNIIGRNLLTQIGCT
HIV_VAX_ClassII_POL_1047	GQETAYFILKLAGRWPVKVIHTD
HIV_VAX_ClassII_POL_1048	GIGGFIKVRQYDQILIEICGKKAI
HIV_VAX_ClassII_POL_1049	LWKGEGAVVIQDNSDIKVVPRRK
HIV_VAX_ClassII_POL_1050	WYQLEKEPIVGAETFYVDGAANR
HIV_VAX_ClassII_POL_1051	NPEIVIQYMDDLYVGSLEIGQ
HIV_VAX_ClassII_VIF_1052	RWQVMIVWQVDRMRIRTWNSLVK
HIV_VAX_ClassII_VPR_1053	IIRILQQLLFIHFRIGCQHSRIG
HIV_VAX_ClassII_VPR_1053	CYCKHCSYHCLVCFQTKGLGISY
HIV_VAX_ClassII_REV_1055	QNPDIVIQYMDDLYVGSLEIG
HIV_VAX_ClassII_VPU_1056	AIVVWSIVFIEYRKILRQRKIDR
HIV_VAX_ClassII_ENV_1057	WLWYIKIFIMIVGGLIGLRIIFA
HIV_VAX_ClassII_ENV_1058	IVGGLIGLRIVFAVLSIVNRVRQ
HIV_VAX_ClassII_ENV_1059	RSLCLFSYHRLRDLLLIVTRIVE
HIV_VAX_ClassII_ENV_1060	AVGIGAVFLGFLGAAGSTMGAAS
HIV_VAX_ClassII_ENV_1061	RIVFAVLSIVNRVRQGYSPFSQ
HIV_VAX_ClassII_NEF_1062	VGFPVRPQVPLRPMTYKAAVDLS

2-6. ENZYME LINKED IMMUNOSPOT (ELISPOT):

2-6-1. Protocole :

2-6-1-1. Préparation des plaques :

Nous avons utilisé des plaques de 96 puits pré-sensibilisées par un anticorps monoclonal anti-IFN- γ de souris : IgG1 purifié (mAb1-D1K, MABTECH, Suède) à la concentration de 1 μ g/ml dans du PBS (Phosphate Buffer Saline, DPBS, Hyclone, Logan, Utah) . Après un lavage minutieux par du PBS répété 4 fois, la plaque a été bloquée pendant 1 heure au moins par le milieu de culture nommé R10 contenant 200 ml RPMI (HyQ-RPMI 1640 Hyclone, Logan, Utah), 10% de sérum stérile (Human Sérum Type AB, Valley Biomedical, In.) et trois antibiotiques : Penicilline-streptomycine (Sigma, St Louis, Mo) et la gentamycine (GibcoTM, Invitrogen Corporation, Chine) aux volumes respectifs de 2,5 ml et 0,5 ml.

2-6-1-2. Préparation des cellules:

Les PBMCs ont été séparées par centrifugation de gradient de densité par du Ficoll (LymphoprepTM, Oslo, Norvège) en adoptant le protocole suivant **(62)** :

- diluer 15 ml de sang avec 30 ml de RPMI dans des tubes stériles de 50 ml, inverser soigneusement pour bien mélanger ;
- pipeter 15 ml de Ficoll dans deux nouveaux tubes, et ajouter doucement 30 ml de sang dilué en prenant soin de ne pas mélanger les deux phases.
- fermer les tubes et les centrifuger à 2200 rpm pendant 20 mn (sans frein à la température ambiante). Après la centrifugation on obtient trois couches: le culot globulaire, la solution de Ficoll, la couche leucocytaire

- et le plasma. Enlever avec précaution les tubes de la centrifugeuse pour ne pas mélanger les différentes phases. A l'aide d'une pipette pasteur, prélever et transférer les PBMCs dans un nouveau tube ;
- laver ces cellules avec du RPMI, inverser pour mixer puis centrifuger 14000 rpm pendant 7 mn (frein minimum à la température ambiante). Rejeter le surnageant, et suspendre le culot dans du R20 (20% de sérum dans le milieu RPMI).

Pour tester la viabilité des cellules, cette solution était mélangée à volume égal avec du trypan bleu dilué au 1/5. Le comptage des PBMCs vivants était effectué dans un hematocytomètre (Hausser scientific, Horsham, PA, USA) par un microscope optique à l'objectif 10X (Nikon Model Eclipse E400, japon).

6-1-3. Dilution de peptides:

Les peptides sous forme lyophilisée étaient solubilisés dans du Diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma, St Louis, Mo) et dans du RPMI 1640 à la concentration stock de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Pour chaque nouveau test, les peptides ont été fraîchement dilués dans du RPMI 1640 pour obtenir une concentration finale de 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dans chaque puits. Des contrôles négatifs constitués de DMSO et du RPMI 1640 ont été inclus dans la plaque en plus des contrôles positifs faits de PHA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) et de CEF (Control Pool Peptide:100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) dilués dans RPMI 1640 avec des concentrations finales respectives de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

2-6-1-4. Incubation des cellules:

Après avoir rejeté le milieu de culture, 100 µl de cellules (~200.000) sont ajoutés à 100 µl de peptides déjà dans les puits. Pour éviter toute évaporation, la plaque a été recouverte d'une feuille d'aluminium puis incubée dans un incubateur à CO₂ (Sweldon manufacturing, Inc.) avec une humidité relative de 80%, une température de 37°C et le gaz CO₂ à 5% pendant 18 heures pour les peptides de classe I et 21 heures avec de peptides de classe II. Toutes ces étapes étaient effectuées dans des conditions strictes de stérilité sous une hotte à flux laminaire (Labconco, Corporation Missouri).

6-1-5. Détection des spots :

Après l'incubation, le contenu de chaque puits est rejeté et chaque puits est lavé avec 200 µl du PBS-Tween (250 µl de Tween 20, dans 500 ml de PBS). Ensuite deux lavages ont été effectués avec du 1X PBS (DPBS, Hyclone, Logan, Utah).

Cent µl du second anticorps biotinylé anti-IFN-γ de détection (mAb 7-B6-1-biotin MABTECH, Suède) dilués à 1µg/ml dans du PBS- BSA 5% (Bovin Serum Albumin, Pierce) et filtrés avec un filtre de 0,22 µm à l'aide d'une seringue de 30 ml sont ajoutés dans chaque puits de la plaque. La plaque a été ensuite incubée pendant 2 heures à 37°C. Après fixation de l'anticorps terminal, nous avons lavé 5 fois avec du PBS-Tween 0,05% puis une fois avec du PBS. Après ce lavage, 100 µl du complexe enzymatique d'avidine (PBS-Tween 0,01% plus une goutte des solutions A et B (Vectastain ABC Peroxydase Kit, Vector Laboratories) ont été logés dans chaque puits et la plaque a été ensuite incubée pendant une heure à la température ambiante.

Cette incubation était suivie de deux lavages par du PBS-Tween 0,05 % et 3 fois par du PBS. Le substrat a été enfin ajouté et incubé pendant 4 minutes à la température ambiante. La réaction était arrêtée avec 5 lavages de la plaque à l'eau de robinet en prenant soin d'enlever le plastique de sécurité. La plaque a été séchée à l'obscurité pendant toute la nuit.

La solution du substrat a été préparée à partir du protocole suivant :

- Préparer la solution tampon d'acétate avec :
 - 46,9 ml d'eau stérile (Gibco™, Invitrogen Corporation, Chine)
 - 11 ml d'acétate de sodium (0,1 M) (Mallinckrodt Baker, Inc.)
 - 4,6 ml d'acide acétique (1 N) (Mallinckrodt Baker, Inc.)
- Diluer le comprimé d'AEC (3-Amino-9-EthylCarbazole) avec 2,5 ml de diméthylformamide (DMF, Mallinckrodt Baker, Inc.) puis 47,5 ml de solution tampon d'acétate dans un tube de 50 ml
- Ajouter 25 µl d'eau oxygénée H₂O₂, transférer dans une seringue de 60 ml et filtrer avec un filtre de 0,45 µm.

2-6-1-6. Comptage des spots :

Après séchage de la plaque, les spots étaient comptés à l'aide d'une loupe (*Stemi SV6*).

2-6-2. Interprétation des résultats:

Une réaction était dite positive lorsqu'il y avait 20 spots pour 1 million de cellules soit 4 spots pour les 200 000 cellules mis en incubation. Ce nombre devait être plus de deux fois supérieures à celui du contrôle négatif.

2-7. CONSIDERATIONS ETHIQUES :

Notre étude a été approuvée par le comité d'éthique de la Faculté de Médecine, Pharmacie et d'odontostomatologie de l'Université de Bamako (Lettre N°03014/FMPOS, voir Annexe). Nous donnons le protocole d'étude à nos sujets, ils étaient inclus après leur consentement éclairé. Pour préserver leur anonymat, seul le chercheur principal gardait sous clé la fiche de consentement et donnait des codes d'identifications pour chaque individu. Ce code était : Sérologie_N°_MB_Date (MB :Mali-Bamako).

2-8. SAISIE ET ANALYSES DES DONNEES :

Les données ont été saisies sur le logiciel Excel 2000. Elles ont ensuite été converties sur SPSS version 11.0 pour l'analyse. Le Normal Theory Test (*person-time*) (63) a été utilisé pour prendre en compte la durée de l'étude et pouvoir faire un calcul d'incidence. L'obtention d'une probabilité p inférieure ou égale à 0,05 montrait un lien statistique entre les variables comparées.

RESULTATS

3- RESULTATS :

TABLEAU VII : DISTRIBUTION DE NOTRE POPULATION D'ETUDE SELON LES GROUPES D'AGE.

Classe d'âge (ans)	Effectif	Pourcentage (%)
18-28	9	25,72
28-38	16	45,72
38-48	8	22,85
>48	2	5,71
Total	35	100

La tranche d'âge la plus représentée était celle de 28 à 38 (45,72%). Elle était suivie de la classe 18 à 28 ans (25,72%). Les âges extrêmes étaient 20 et 54 ans avec une moyenne de 33,97± 1,5.

TABLEAU VIII: DISTRIBUTION DE NOTRE POPULATION D'ETUDE SELON LE SEXE.

Sexe	Effectif	Pourcentage (%)
Masculin	23	65,71
Féminin	12	34,29
Total	35	100

Notre échantillon comprenait plus de sujets masculins que féminins, soit 65,71% contre 34,29%. Le sexe ratio était de 1,9 en faveur du sexe masculin.

TABLEAU IX: DISTRIBUTION DE NOTRE POPULATION D'ETUDE SELON LA SEROLOGIE.

Sérologie	Effectif	Pourcentage (%)
VIH +	30	85,71
VIH -	5	14,29
Total	35	100

L'infection à VIH constituait 85,71% (30/35) de notre population d'étude. Les donneurs VIH négatifs représentaient 14,29% de notre échantillon.

TABLEAU X: PREVALENCE MENSUELLE DU VIH CHEZ LES DONNEURS DE SANG AU CNTS AU COURS DE LA PERIODE D'ETUDE (AOUT 2003-AVRIL 2004).

Mois	Effectif des donneurs de sang	Effectif des donneurs VIH positifs	Pourcentage
Août	2449	55	2,25
Septembre	1358	52	3,83
Octobre	2055	64	3,11
Novembre	986	38	3,85
Décembre	1716	77	4,48
Janvier	1180	32	2,71
Février	1184	48	4,05
Mars	1653	43	2,60
Avril	1051	64	6,08
Total	13632	443	3,25

La prévalence du VIH était de 3,25% chez les donneurs de sang avec les extrêmes en Avril (6,08%) et Août (2,25%),

TABLEAU XI : DONNEURS VIH POSITIFS TESTES PAR L'ELISPOT AU COURS DE LA PERIODE D'ETUDE

Mois	Effectif des donneurs VIH positifs	Effectif des donneurs testés par ELISpot	Pourcentage
Août	55	3	5,45
Septembre	52	5	5,76
Octobre	64	7	10,93
Novembre	38	3	7,89
Décembre	77	4	5,19
Janvier	32	3	9,37
Février	48	3	6,25
Mars	43	1	2,32
Avril	64	1	1,56
Total	443	30	6,77

Au cours de cette étude, nous avons testé 30 sujets VIH positifs sur 443 personnes dépistées au CNTS soit 6,77% des donneurs positifs au VIH. C'est au mois d'Octobre que nous avons eu le plus grand nombre de sujets soit 10,93% (7/64).



photo 7: Réponse positive, spots>30.

Cette photo est un cas de réponse positive obtenue chez un de nos sujets d'étude. Le peptide testé (HIV_VAX_ClassII_POL_ 1046) a induit la libération d'INF- γ d'où la formation spots.



photo 8: Contrôle positif: PHA, spots>100.

Dans ce puits à la place des peptides, on a stimulé les cellules T de la même personne par le PHA. L'intensité de la réponse est plus grande.



photo 9: Réponse négative, contrôle négatif: spots=0

Les cellules n'induisent pas la libération d'INF- γ à l'absence de peptides dans ce puits. Les réponses n'ont spécifiques sont nulles.

TABLEAU XII : REPARTITION DES EPITOPES SELON LA NATURE DES PROTEINES

Protéines	Epitopes					
	Classe II (CD4+)		Classe I (CD8+)		Total	
	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%
Env	5	25	2	20	7	23,33
Gag	3	15	1	10	4	13,33
Pol	6	30	3	30	9	30
Tat	1	5	1	10	2	6,67
Rev	1	5	1	10	2	6,67
Nef	1	5	0	0	1	3,33
Vif	1	5	1	10	2	6,67
Vpu	1	5	1	10	2	6,67
Vpr	1	5	0	0	1	3,33
Total	20	100	10	100	30	100

Trente pour cent (30%) des épitopes conçus pour notre étude étaient obtenus à partir des protéines Pol. Les peptides Env et Gag représentaient respectivement 23,33 et 13,33 % des épitopes utilisés.

TABLEAU XIII: IMMUNOGENICITE DES EPITOPES CHEZ LES DONNEURS VIH POSITIFS

Epitopes	Classe I		Classe II		Total	
	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%
Positive	7	70	18	90	25	83,33
Négative	3	30	2	10	5	16,67
Total	10	100	20	100	30	100

Parmi les épitopes testés, 83,33% induisaient une réponse immunitaire chez au moins un des donneurs VIH+.

TABLEAU XIV: FREQUENCE DE LA REPONSE CD4+ (EPITOPES DE CLASSE II) DANS LA POPULATION D'ETUDE.

Réponse CD4+	VIH+		VIH -		Total	
	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%
Positive	16	53,33	2	40	18	51,43
Négative	14	46,67	3	60	17	48,57
Total	30	100	5	100	35	100

Sur les 35 sujets, 18 personnes ont répondu favorablement soit 51,43% de notre échantillon. Parmi les donneurs du groupe VIH +, 53,33% ont reconnu les peptides CD4+ de classe II (16/30). Chez les 5 sujets non infectés par le VIH (groupe VIH-), 40% ont donné une réponse CD4+.

TABLEAU XV: FREQUENCE DE LA REPONSE CD8+ (EPITOPES DE CLASSE I) DANS LA POPULATION D'ETUDE.

NB : Dans notre étude échantillon, 22 personnes sur 35 ont été testées par les épitopes de Classe I

Réponse CD8+	VIH+		VIH -		Total	
	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%
Positive	4	19,05	0	0	4	18,18
Négative	17	80,95	1	100	18	81,82
Total	21	100	1	100	22	100

Sur les 22 sujets, quatre donneurs VIH positifs ont répondu à ces peptides soit 18,18% (4/22). Tous les sujets qui ont répondu étaient VIH+ (19,05% des donneurs VIH+) et le seul sujet séronégatifs (VIH -) testé n'a pas donné pas de réponse.

TABLEAU XVI: FREQUENCE DES REPONSES AUX EPITOPES SELON LA NATURE DES PROTEINES CHEZ LES DONNEURS VIH POSITIFS.

Protéines	Groupe VIH+				Total
	Positifs au épitopes		Négatifs au épitopes		
	Effectif	%	Effectif	%	
Env	6	20	24	80	30
Gag	9	30	21	70	30
Pol	9	30	21	70	30
Tat	4	13,33	26	86,67	30
Rev	5	16,67	25	83,33	30
Nef	4	13,33	26	86,67	30
Vif	5	16,67	25	83,33	30
Vpu	1	3,33	29	96,67	30
Vpr	2	6,67	28	93,33	30

Les épitopes obtenus à partir des protéines Gag et Pol induisaient la libération d'IFN- γ chez 30% des donneurs VIH positifs (9/30). Ils étaient suivis par les épitopes des protéines Env qui étaient reconnus par 20% de nos sujets d'études.

TABLEAU XVII: DISTRIBUTION DE LA REPONSE CELLULAIRE (CD4+, CD8+) EN FONCTION DE LA NATURE DES PROTEINES CHEZ LES DONNEURS VIH POSITIFS.

Protéines	Epitopes					
	Réponses	Immunogènes		Non-Immunogènes		Total
		Effectif	%	Effectif	%	
Env	CD4+	3	60	2	40	5
	CD8+	1	50	1	50	2
Gag	CD4+	3	100	0	0	3
	CD8+	1	100	0	0	1
Pol	CD4+	6	100	0	0	6
	CD8+	3	100	0	0	3
Tat	CD4+	1	100	0	0	1
	CD8+	1	100	0	0	1
Rev	CD4+	1	100	0	0	1
	CD8+	1	100	0	0	1
Nef	CD4+	1	100	0	0	1
	CD8+	----	----	----	----	----
Vif	CD4+	1	100	0	0	1
	CD8+	0	100	1	100	1
Vpu	CD4+	1	100	0	0	1
	CD8+	0	0	1	100	1
Vpr	CD4+	1	100	0	0	1
	CD8+	----	----	----	----	----

Parmi les épitopes des protéines majeures (Env, Gag, Pol), ceux élaborés à partir de Gag et Pol ont été les plus immunogènes (100%). Par contre les peptides conçus de Env ne le sont qu'à 60%.

NB : ---- = Pas d'épitopes conçus pour la protéine.

TABLEAU XVIII: RESULTATS ANALYTIQUES

Protéines	Effectif des réponses positives	Effectif des types de réponses positives	Incidence
Env	6	6	1,7361
Gag	9	15	2,8935
Pol	9	25	4,8225
Tat	4	2	0,8680
Rev	5	4	1,3888
Nef	4	4	1,7361
Vif	5	5	1,7361
Vpu	1	1	1,7361
Vpr	2	2	1,7361
Total	----	64	----

Incidence : effectifs de réponses x 1000/ person-time-protéine

Person-time-protéine= Effectifs des réponses x Total des types de réponses x période d'étude (63).

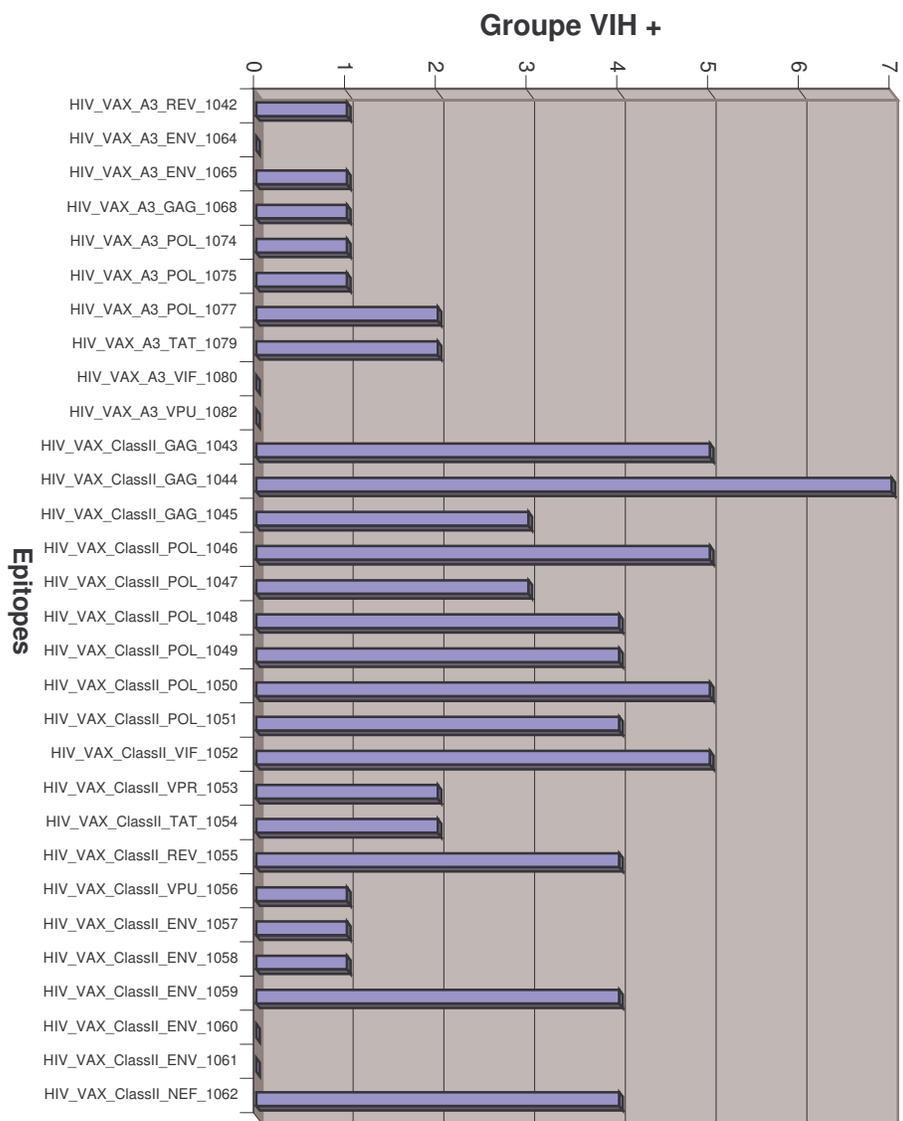
- Person-time, $p_{(Gag, Env)} = 0,0076$

- Person-time, $p_{(Pol, Env)} = 0,0308$

- Person-time, $p_{(Pol, Gag)} = 0,3144$

Il découle de ces tests que la dominance des épitopes conçus à partir de Gag et Pol est statistiquement significative.

Graphique 10: Fréquence de la Réponse à chacun des Epitopes chez les Donneurs VIH Positifs.

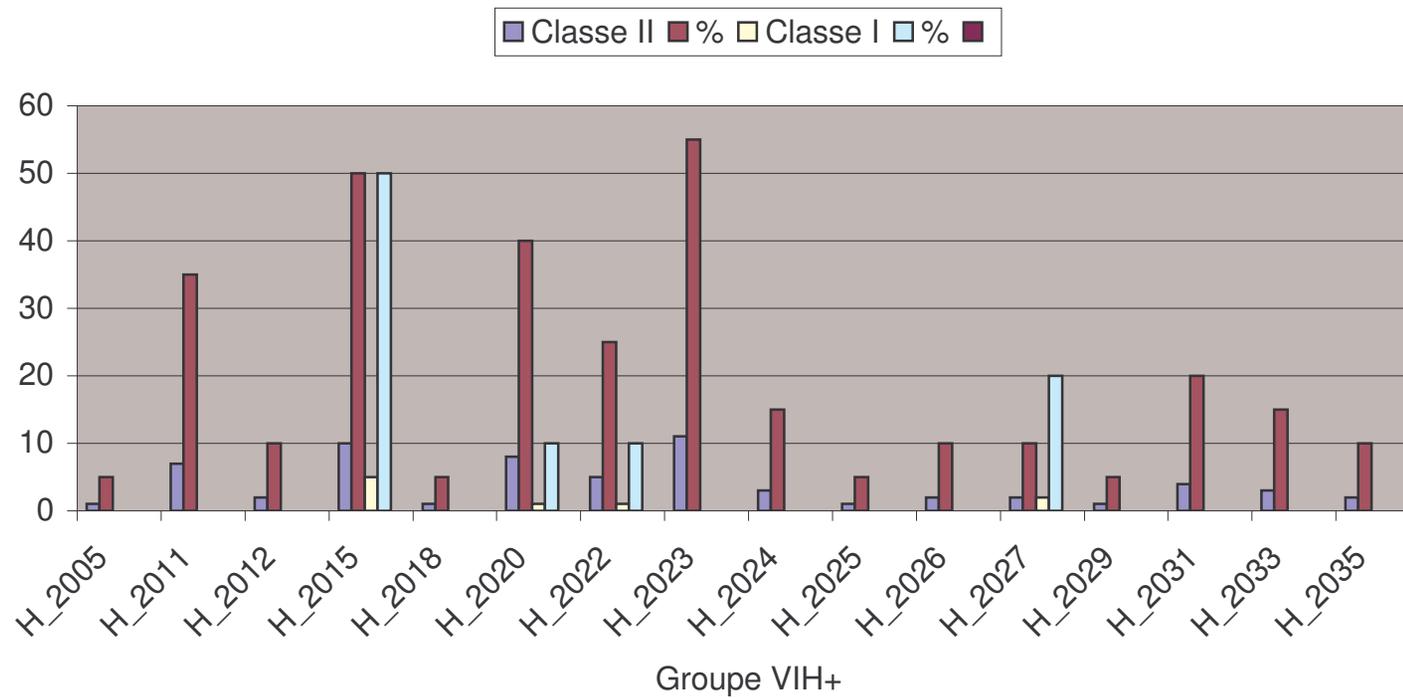


Les peptides de classe II tel que l'épitope HIV_VAX_ClassII_GAG_1044 conçu à partir de Gag a induit une réponse CD4+ chez 7 de nos sujets d'étude VIH positifs. Les épitopes (HIV_VAX_GAG_1043, HIV_VAX_POL_1046, HIV_VAX_ClassII_POL_1050, HIV_VAX_ClassII_VIF_1052) ont donné une réponse CD4+ significative avec 5 des donneurs VIH positifs alors que les peptides (HIV_VAX_ClassII_ENV_1060, HIV_VAX_ClassII_ENV_1061) ne n'ont pas été reconnus.

Parmi les épitopes A3 de Classe I: HIV_VAX_A3_POL_1077, HIV_VAX_A3_TAT_1079 ont été les immunogènes.

Par contre les peptides HIV_VAX_A3_ENV_1064, HIV_VAX_A3_VIF_1080, HIV_VAX_A3_VPU_1082, n'ont induit aucune réponse (voir graphique 10).

Du point de vue moléculaire, il existe un chevauchement entre les séquences de Gag 1043 et 1044. C'est à dire que ces deux peptides partagent un motif qui est à l'origine de leur immunogénicité. Ce motif est **ILGLNKIVRMYS**PV.



Graphique 11: Variation de la Réponse Immunitaire aux deux Classes d'Épitopes chez les Donneurs VIH Positifs.

Les donneurs séropositifs au VIH ont reconnu beaucoup plus les peptides de classe II que ceux de classe I et tous les sujets qui ont une réponse CD8+, produisaient INF- γ suite à une stimulation par les épitopes CD4+. Parmi ceux ci un seul donneur a répondu à 50% des peptides des deux classes (voir graphique 11).

COMMENTAIRES DISCUSSIONS

4- COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS:

L'objectif de cette étude était de valider les peptides des souches virales du VIH-1, identifiés comme conservés et immunogènes par les outils de bioinformatique. Le protocole initial demandait une estimation de la charge virale et le comptage des lymphocytes T CD4+. Nos structures n'ayant pas cette capacité technique, nous avons utilisé l'idée que les donateurs bénévoles sont cliniquement bien portants et que leur taux de CD4+ serait supérieur à 200. Ces sujets pouvant donc avoir assez de cellules immunocompétentes pour le test d'induction de l'INF- γ (ELISpot). Donc, nous avons pris comme population d'étude les donateurs bénévoles de sang séropositifs qui se sont présentés entre Août 2003 et Avril 2004 au CNTS.

Nous avons enrôlé plus d'hommes (65,71%) que de femmes (34,29%), cette différence s'explique par le fait que les hommes sont plus aptes à faire le don de sang (Tableau VIII).

Durant la période de notre étude, 13632 dons de sang ont été réalisés au CNTS, la prévalence moyenne était de 3,25% (Tableau X). Cette prévalence moyenne ne diffère pas de celles obtenues par Soureya et *al.*, lors d'une étude prospective faite au CNTS (la prévalence était de l'ordre de 3%) (63). Ce taux peut bien refléter la réalité épidémiologique de l'infection à Bamako. La dernière enquête démographique et de Santé du ministère de la Santé (EDSM-III) a donné une prévalence de 2,5% de l'infection à VIH-1 inférieure à celle obtenue au CNTS (4).

Parmi les 443 donateurs VIH positifs (Tableau X, XI), nous avons pu tester 30 donateurs pour notre étude soit 6,77% (Tableau XI). Notre étude n'a pas les moyens financiers pour tester la totalité de ces échantillons et aussi le

critère des poches fraîchement collectées dans les 6 heures a limité le nombre de poche de sang à tester. Les 30 poches VIH positives obtenues étaient suffisantes pour les analyses statistiques. C'est au mois d'octobre que nous avons enregistré le plus grand nombre de poches VIH positifs avec 10,93% (Tableau XI) et le petit nombre de poches le dernier mois de l'étude. Cette différence pourrait s'expliquer par l'intervalle entre le don de sang et le temps du test sérologique qui dépassait 6 heures pour les sangs collectés l'après midi. Un sang collecté l'après midi et dépisté le lendemain ne pouvait pas être utilisé pour le test ELISpot.

Parmi les 35 sujets (30 donneurs positifs+ 5 témoins), 16 sujets VIH positifs ont reconnu les épitopes des CD4+ soit 53,33% (Tableau XIV). On a obtenu une réponse positive avec deux donneurs VIH négatifs sur les 5 témoins (Tableau XIV). Bien que ces individus soient séronégatifs au VIH, ils étaient infectés par le VHB ou le VHC. Cette réponse positive aux épitopes conçus des protéines virales du VIH-1 pourrait s'expliquer par une réaction croisée (épitope dont la séquence serait partagée entre les souches virales de VIH-1 et celles du VHB ou VHC). En plus du test sérologique, nous avons testé la présence de l'ADN génomique du VIH-1 chez ces deux donneurs par la PCR. Le résultat était négatif. Une étude approfondie serait nécessaire pour éclaircir ce phénomène.

La réponse des cellules CD8+ aux épitopes de classe I a été observée chez 4 des 22 donneurs testés soit 18,18% (Tableau XV). Nous avons remarqué que les sujets ont peut répondu à cette classe de peptides. Cela pourrait être dû au polymorphisme du HLA. Les épitopes de Classe I que nous avons utilisés sont A3 alors qu'une étude faite au Mali par Allsop et *al.*, a montré que HLA A3 ne représente que 3,7% contre 15,9% pour A2 (65). Il serait bon de faire le typage du HLA pour connaître le statut de la personne avant de la tester par les épitopes de classe I ou de concevoir des épitopes de classe I qui sont pluri-alléliques. Une étude antérieure faite par Degroot et *al.*, de Brown University a montré que lorsque les sujets possédaient tous l'allèle A3 la réponse aux épitopes A3 était meilleur (61).

Les épitopes conçus à partir des protéines Pol et Gag sont les plus fréquemment reconnus d'une manière statistiquement significative par rapport aux autres épitopes (Tableau XVIII). Nous avons observé que ces épitopes induisent la production d'INF- γ chez 30% des donneurs VIH positifs (9/30) alors que les protéines d'enveloppe (Env) ne sont reconnues que par 20% de nos sujets (Tableau XVI). Nous pouvons expliquer que quoique les épitopes Env soient immunogènes, ils peuvent être polymorphiques (diversité de séquence) entraînant un échappement immunitaire. Cette diversité génétique de l'enveloppe serait la conséquence d'une pression immunitaire dont cette membrane virale est exposée. D'où l'échec des premiers candidats vaccins contre le VIH-1 (5).

En plus de leur conservation, le fait que Pol et Gag induisent une libération d'INF- γ , montre leur capacité antigénique. Ce qui fait d'eux des candidats potentiels pour la mise au point d'un vaccin. A

cause de la diversité des souches du VIH-1, l'idéal sera d'identifier le Talon d'Achille du Virus c'est à dire des peptides bien conservés parmi toutes les souches virales et immunogéniques.

Nos résultats montrant la conservation et l'immunogénicité des épitopes Gag et Pol ont été retrouvés par Huyen et *al.*,**(66)**. Les épitopes des protéines Gag et Pol apparaissent selon notre étude comme ces Talons d'Achille qu'il faut pour la conception d'un vaccin universel.

Si en général les épitopes Gag et Pol apparaissent comme des inducteurs de la production d'INF- γ dans notre étude, nous avons identifié des séquences particulières des peptides pris séparément avec une réponse positive chez les donneurs. Ainsi la séquence : ILGLNKIVRMYS PV de l'épitope HIV_ VAX_ ClassII_ GAG_ 1044 induit la libération d'INF- γ chez 7 des 30 sujets testés et contient le même motif que la séquence HIV_ VAX_ ClassII_ GAG_ 1043 qui est reconnue par 5 des 30 donneurs VIH positifs testés (Graphique 10). D'autres études doivent être menées pour évaluer le rôle du motif : ILGLNKIVRMYS PV dans la reconnaissance et l'induction des cellules T pour la production d'INF- γ .

Les séquences Pol surtout de l'épitope : HIV_ VAX_ ClassII_ POL_ 1046 et HIV_ VAX_ ClassII_ POL_ 1050 ont pu reconnaître et induire une réponse des cellules T CD4+ chez 5 des 30

donneurs. Contrairement aux épitopes Gag (1043,1044), les séquences des épitopes de Pol ne se recouvrent pas.

Au cours de cette étude nous n'avons exploré que l'immunité cellulaire en estimant la quantité d'INF- γ produite par les cellules T *in vitro*. L'approche qui consiste à identifier des épitopes conservés parmi les souches virales de VIH-1 peut être réalisée. Ainsi nous avons identifié des épitopes provenant des protéines de Gag et de Pol qui sont reconnus d'une manière significative par les donateurs bénévoles de sang séropositifs. Ces épitopes peuvent être des candidats pour la mise au point d'un vaccin global contre le SIDA.

CONCLUSION

CONCLUSION

Nous avons mené entre Août 2003 et Avril 2004 une étude prospective pour pouvoir évaluer la réponse immunitaire induite par des épitopes (obtenus à partir des protéines du VIH-1) chez des donneurs volontaires de sang séropositifs recrutés au CNTS et tester au LBMA. Au cours de notre étude, 53,33% des donneurs VIH positif ont induit la libération d'INF- γ après une stimulation par les épitopes CD4+. Les épitopes de Classe I n'ont pas reconnu d'une manière significative les cellules T CD8+ de nos donneurs (18,18%), probablement à cause de la restriction aux antigènes HLA. Nous avons identifié parmi les 30 épitopes testés, 83,33% des peptides ont été reconnus par au moins un des donneurs. Les peptides de classe II conçus à partir des protéines Gag et Pol sont les plus immunogènes. Nous avons trouvé que le motif ILGLNKIVRMYS PV présent dans les séquences peptidiques de Gag (1043, 1044) était associé à une bonne reconnaissance des cellules T et induisait de la production d'INF- γ .

Cette étude nous a permis d'aboutir aux conclusions suivantes :

- les épitopes obtenus à partir des protéines du VIH-1 (par outils de Bioinformatique) sont capables d'induire une réponse à médiation cellulaire CD4+ et CD8+;

- les épitopes conçus à partir de Gag et Pol de part leur immunogénicité sont des candidats potentiels pour la conception d'un vaccin anti-VIH-1.

RECOMMENDATIONS

RECOMMANDATIONS :

Au terme de notre étude, nous formulons les recommandations suivantes :

- Continuer cette étude sur un échantillonnage plus grand en éclaircissant toutes les questions qui ont été soulevées ;
- Approfondir les recherches sur les protéines du Gag et Pol ;
- Faire le séquençage complet du gène *gag* pour voir si la séquence ILGLNKIVRMYS PV est conservée chez toutes les souches virales ;
- Explorer d'avantage la physiopathologie du VIH-1 pour pouvoir contourner tous les obstacles qui rendent difficile la conception de ce type de vaccin ;
- Favoriser le renforcement des capacités des deux laboratoires (CNTS, LBMA) par le transfert des technologies adéquates pour pouvoir déterminer la charge virale, le taux de lymphocytes T CD4+ et le typage HLA de chaque sujet d'étude ;
- Susciter la recherche et le développement de candidat-vaccins universels contre toutes les formes du VIH.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- 1- Mazer A., Sankalé.** Guide de Médecine en Afrique et Océan Indien, 3^{ème} édition : *Edicef* 1992. 639p.

- 2- Girard P.M., Katlama C.H., Pialoux G.** VIH, 6^{ème} édition : *Doin* Paris 2004. 635p.

- 3- ONUSIDA/OMS.** Le point sur l'épidémie de SIDA: Décembre 2003. Genève 2003. www.unaids.org

- 4- Mohamed A, Isaka N, Flabou B.** Test de dépistage du VIH. In : cellule de planification et de statistique du ministère de la Santé (CPS/MS), Direction National de la Statistique et de l'Informatique (DNSI) et ORC Macro. 2002. *Enquête Démographique et de Santé au Mali 2001*. Claverton, Maryland, USA : CPS/MS, DNSI et ORC Macro. pp 279-287.

- 5- Fisher E, Guillet J.G., Kazatchkine M, et al.** Recherche vaccinale contre le VIH à l'ANRS : *édition Epilobe* Paris 2003. 79p.

- 6- Gary P. Wormser.** AIDS and others manifestations of HIV infection, second edition: *Raven Press Ltd., New york* 1992. 715p.

- 7 - Center for Diseases Control.** Pneumocystis pneumonia- Los Angeles, *MMWR*. 1981,30: 250-252.
- 8- Mirko DG.** Histoire du SIDA, 2^{ème} edition. Paris: *Payet Paris*. 1990, 392p.
- 9- Sonigo P, Alizon M.** Les virus VIH. *In: L'objectif medical. Le SIDA, Edition Afrique noire francophone. Special et hors serie.* Decembre 1989: pp 6-20.
- 10- Essex M, Mclane MF, Lee TH et al.** Antibodies to cell membrane antigens associated with human T-cell leukemia virus in patients with AIDS, *Science*. 1983; 220: 859-862.
- 11- Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP et al.** Isolation of human T-cell leukemia-lymphoma virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS), *Science*. 1983; 220: 865-868.
- 12- Barre-Sinoussi F, Cherman JC, Rey F et al.** Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for immune deficiency syndrome (AIDS), *Science*; 1983, 220: 868-871.
- 13- Gallo RC, Salahuddin SZ, popovic M et al.** Human T-lymphotropic virus type III, HTLV-III, isolated from AIDS patients and donors risk for AIDS, *Science*. 1986; 224: 500-503.
- 14- Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet et al.** Isolation of a new huan retrovirus from west African patients with AIDS, *Science*. 1986; 223: 343-346.

- 15- Coffin J, Haase A, Levy JA et al.** What to call the AIDS virus, *Nature*. 1986, 321: 10.
- 16- Weiss R. A, Teich N, Varmus H, Coffin J.** RNA Tumor viruses, Cold Spring Harbor laboratory Ed., New york, 1982.
- 17- Marc R, Itoua-N'gaporo A.** *SIDA, infection a VIH: aspects en zone tropicale*. Ellipse Paris / AUPELF. 336 p.
- 18- Jean-Marie Huraux, Henri Agut, Jean-Claude Nicolas et al.** *Traité de virologie médicale, Estem*. 2003. 699p.
- 19- Jean-Claude Kaplan, Marc Delpech.** *Biologie Moléculaire et médecine: Les retrovirus*. 2^{ème} édition. Flammarion Paris. 2000. 790p
- 20- F. Barin.** *Retroviridae: les Virus de l'immunodéficience Humaine (VIH), virologie médicale*. Collection azay , A. Mamette. Septembre 2002; 798:569-594
- 21- Thomson JD, Higgins DJ, Gibson TJ et Clustal W.** Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap

penalties and weight matrix choice, *Nucleid acids Res.* 1994; 22, 4673-4680.

22- Beatrice H. Hahn, George M. Shaw, Kevin M.De Cock, Paul M. Sharp.

AIDS as a Zoonosis: Scientific and Public Health Implications, *Science*, Vol 287. 28 january 2000; 607-614.

23- Human retrovirus and AIDS 1998. A compilation and Analysis of Nucleid acid and amino acid sequence (*Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, 1988*), <http://hiv-web.lanl.gov>

24- F. Brun-Vézinet, F. Damond et F.Simon. Variabilité des virus de l'immunodéficience humaine de type 1, Journée SPE du 13 octobre 1999 à l'institut Pasteur à Paris: "Génétique et maladies infectieuses dans l'environnement tropical".

25- McCutchan FE, Salminen MO, Carr JK et Burke DS. HIV-1 genetic diversity, *AIDS.* 1996; 10, S13-S20.

26- Peeters M, Gueye A, M'Boup S et al. Geographical distribution of HIV-1 group 0 in Africa, *AIDS.* 1997; 11: 493-498.

- 27- Simon F, Mauclore P, Roques P et al.** Identification of new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O, *Nat Med.* 1998; 4: 1032-1037.
- 28- Keith A. Crandall, Daniel Vasco, David Posada and Hiromi Imamichi.** Advances in understanding the evolution of HIV, *AIDS.* 1999; 13 (suppl A) S1-S9.
- 29- Phyllis J Kanki.** Human Immunodeficiency virus type-2 (HIV-2). *AIDS review* 1999; 1: 101-108.
- 30- ONUSIDA/OMS.** Le point sur l'épidémie de SIDA: Décembre 2001. Genève 2001. www.unaids.org
- 31- Le VIH/SIDA au Mali.** Evolution et impacts sur le développement. *Ministère de la Santé, Policy Project/USAID, Bamako.* Janvier 2002; 54p.
- 32- Chen YM, Lee CM, Lin RY, Chang HJ.** Molecular epidemiology and trends of HIV-1 subtypes in Taiwan, *J Acquired Immune Defic Syndr Hum Retroviral.* 1998; 19: 393-402.

- 33- Liitsola K, Holm K, Bobkov A et al.** An AB recombinant and its parenteral HIV type 1 strains in the area of the former Soviet Union: low requirements for sequence identity in recombination. UNAIDS Virus Isolation Network. *AIDS Res Hum Retrovirus* 1000; 16: 1047-53
- 34- Peeters M, Koumare B, Mulanga C et al.** Genetic subtypes of HIV type-1 and HIV-2 type-2 strains in commercial sex workers from Bamako, Mali. *AIDS Res Hum Retrovirus* 1998; 14: 51-8.
- 35- Montavon C. Toure-Kane C. Nkengasong JN. et al.** CRF06-cpx: a new circulating recombinant form of HIV-1 in West Africa involving A, G, K, J. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2002 Apr 15; 29(5): 522-30.
- 36- Montavon C. Bibollet-Ruche F. Robertson D et al.** The identification of a complex A/G/I/J recombinant HIV type 1 virus in various West African countries, *AIDS Research and Human Retrovirus*. 1999 Dec 10; 15(18): 1707-12.
- 37- Centers for Diseases Control, Task Force on Kaposi's Sarcoma and Opportunistic Infections.** Epidemiologic aspects of the current outbreak of Kaposi's sarcoma and opportunistic infections, *N. Engl. J. Med.* 1982; 306: 246-252.

38- Centers for Diseases Control. Revision of the case definition of acquired immunodeficiency syndrome for national reporting-United States, *MMWR*. 1985; 34: 373-375.

39- OMS. Deuxième meeting des centres collaborateurs de l'OMS sur le SIDA, *Bull. OMS*. 1986; 64: 221-231.

40- OMS. Syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), Revision 1987 de la définition CDC/OMS du cas de SIDA, *Rel. Epidemio. Hebdo*. 1988; 63: 1-8.

41- Redfiel D.R.R., Wright D.C., Tramont E.C. The Walter Reed staging classification for HTLV III/LAV infection, *N. Engl. J. Med* 1986; 314: 131-132.

42- Centers for Diseases Control. Classification for human T-lymphotropic virus type III/Lymphadenopathy-Associated Virus infections, *Ann. Int. Med.* 1986; 105: 234-237.

43- Fleury HJA. Virologie humaine. 3^{ème} édition. Paris: *Flammarion* Paris 1999. 205p.

- 44- Allain J.P. et coll.** Serologic markers in early stages of human immunodeficiency virus infection in hemophiliacs, *Lancet*. 1986; II: 1233-1236.
- 45- Tindall B. et coll.** Characterization of the acute clinical illness associated with human immunodeficiency virus infection , *Arch. Intern. Med.* 1988;148: 945-949.
- 46- Cooper D. A. et coll.** Acute AIDS retrovirus infection, *Lancet*. 1985; I: 537.
- 47- Samson M, Libert F, Doranz BJ , et al.** Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR5 chemokine receptor gene, *Nature*. 1996; 382: 722-725.
- 48- Smith MW, Dean M, Carrington M, et al.** Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression, *Science*. 1997; 277: 959-965.
- 49- The Biology project, Immunology.** ELISA Activity: False positives; www.biology.arizona.edu

50- Mullis K, Faloona T, Scharf S et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp, *Quant Biol.* 1986, 51: 263-273.

51- Saiki R.K, Gelfand D.H, Stoffel S. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science.* 239: 487-491.

52- Bayer® HIV-1 RNA 3.0. Assay (bDNA), 117128 Rev. C, 6/2000

53- Power C.A, C. L. Grand, N. Ismail, et al. A valid ELISpot assay for enumeration of ex vivo, antigen-specific, IFN- γ -producing cells. *J. Immunol*, 1999. Methods 227: 99-107.

54- Jeffrey G. Smith, XU Liu, Robin M. Kaufhold et al. Development and validation of a Gamma Interferon ELISpot Assay for Quantitation of cellular Immune Responses to varicella-Zoster Virus. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, Sept 2001, p. 871-879.

55- Fishl M.A, Richmann D. D, Grieco M. H. et al. The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS related complex: a double-blind, placebo-controlled trial, *N. Engl. J. med.* 1987, 317: 185-191.

56- Rapport sur les sites sentinelles, Juin 2003.

57- Cisse Bazoumana Ibrahima. Infection à VIH/SIDA: Le point sur la recherche vaccinale. *thèse de médecine*, FMPOS, Bamako 2003.

58- Esparza J. An HIV vaccine: How and When? *Bull. Off the Who 2001*; 79: 1133-1137.

59- Timothy Mastro. Passage à la phase III des essais d'efficacité, *Rapport final de la conférence internationale d'Abidjan*. 2001.

60- The GAIA AIDS Vaccine Project/Bamako, Mali.
www.GAIAvaccine.org

61- Degroot A. S, Jesdale B, Martin W, et al. Mapping cross-clade HIV-1 vaccine epitopes using a bioinformatics approach.
www.sciencedirect.com

62- Frank C. Hay, Olwyn M.R Westwood. *Practical Immunology*. 4th Edition: *Blackwell Science Ltd*, 2002. Methods 399: 182-183.

63- Bernard Rosner. Fundamentals of Biostatistics. 5th Edition: *Duxbury*, 2000. 792p.

64- Soureya Z. Dépistage du VIH au Centre National de Transfusion Sanguine de Bamako de 1993 à 1999. *Thèse de Pharmacie*, FMPOS, Bamako 2001, N°9.

65- Allsopp C, Harding R, Taylor C, et al. Interethnic genetic differentiation in Africa: HLA Class I antigen in the Gambia. *Am. J. Hum Genet*, 1992. 50:411-421.

66- Huyen C, Phyllis K, Sankalé J. L., et al. Cytotoxic T-Lymphocyte Cross-Reactivity among Different Human Immunodeficiency Virus Type 1 Clades: Implications for Vaccine Developpement. *Journal of Virology*, Novembre. 1997, p.8615-8623.

ANNEXE

**Université de Bamako (Bamako, Mali) /Brown University (Providence,
Rhode Island, USA)**

**Formulaire de Consentement Eclairé et Volontaire pour Participer à un
Programme de Recherche**

Source de financement : La Faculté de Médecine, Pharmacie et
d'Odontostomatologie (FMPOS), Brown University (Etats-Unis d'Amérique) et
de Campbell Foundation (USA)

Titre de l'étude : Validation des épitopes de cellules T humaines pour le
développement d'un vaccin contre le SIDA.

Site d'étude : Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée (Université de
Bamako) et le Centre National de Transfusion Sanguine (Ministère de la
Santé, Bamako, Mali).

Noms et Adresses des investigateurs

Ousmane Koita, PharmD, PhD

Téléphone : 223 79 25; 222 52 77; 674 9312 ; Email : oakoita@ml.refer.org

Anatole Tounkara, MD, PhD

Téléphone : 221 6608, 227 22 68; 2777 888; Email : cnts-bko@cefib.com

Soukalo Dao, MD

Téléphone: 222 50 03, Email: sdao3@caramail.com

Souleymane Diallo, MD

Téléphone : 222 50 03, 671 0079 ; Email : solo@experco.com

Nous vous invitons à participer à une étude de recherche conduite par la
Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie (Université de
Bamako) et Brown University (Providence, Rhodes Island, USA). Il s'agit
d'une étude menée au Centre National de Transfusion Sanguine (Ministère
de la Santé) et le laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée (Université de
Bamako). Nous vous expliquerons toutes les étapes de l'étude, ensuite, nous
vous demanderons de signer ce formulaire de consentement pour votre
participation à l'étude.

Votre participation est entièrement volontaire. Tous les renseignements
recueillis seront strictement confidentiels et ne seront connus que des
investigateurs. Les fiches individuelles seront mises dans une armoire fermée
à clé et sous la responsabilité du Professeur Anatole Tounkara.

Vous avez le droit de faire lire ce formulaire expliquant les procédures
auxquelles vous serez soumis dans cette recherche. Vous avez le droit de

poser toutes les questions relatives à cette étude aux différents investigateurs. Après, si vous décidez de participer à l'étude, veuillez s'il vous plait signer et dater ce formulaire devant la personne qui vous a expliqué l'étude. Vous aurez une copie de ce formulaire que vous pouvez garder.

1. Nature et but de l'étude

Le Laboratoire de Recherche sur la Tuberculose et le VIH à Brown University en collaboration avec la FMPOS de L'Université de Bamako mène une étude pour développer un vaccin contre le VIH. Le VIH est un virus qui cause le SIDA. Il y a plusieurs types de ce virus à travers le monde. Certains types sont plus communs aux États-Unis et en Europe. D'autres sont plus répandus en Afrique et en Asie. Un vaccin efficace contre le VIH n'existe toujours pas. Cette étude a pour but d'étudier plus profondément comment les fragments du virus synthétisés au laboratoire peuvent reconnaître les anticorps produits par une personne infectée et voir si ces fragments seront reconnus par tous les anticorps anti VIH. Les chercheurs souhaitent utiliser les résultats de cette étude pour développer un vaccin contre le VIH.

Ce projet a deux buts:

- Etudier comment les globules blancs du sang vont réagir à certains fragments du VIH qui sont présent en Afrique, en Asie, et en Inde.
- Analyser la réaction des globules du sang contre les fragments qui sont présent dans tous les types de virus VIH.

Ces fragments du virus VIH seront inclus dans un vaccin qui protégera contre le VIH dans le monde entier. Nous vous informons que votre sang après dépistage pour les agents pathogènes comme les virus de l'hépatite B et C, du SIDA et le tréponème agent de la syphilis est impropre pour la transfusion, par conséquent, il sera détruit. Nous vous demandons que votre sang au lieu d'être détruit, soit utilisé pour la recherche afin d'identifier des vaccins potentiellement efficaces contre le VIH.

2. Explication des Procédures

Si vous acceptez de participer à cette étude, nous allons garder votre poche de sang au cas où elle serait impropre à la transfusion. Votre poche de sang, ne sera pas détruite et pourra servir d'échantillon pour la recherche sur le SIDA. Le sang venant de la poche que vous avez rempli sera séparé en

sérum, culot globulaire et en une couche de globules blancs. La charge virale sera déterminée et le nombre de globules blancs de type CD4+ et CD8+ sera estimée. La séquence des souches virales qui vous infectent sera identifiée. Vos globules blancs seront mis en contact (incubés) avec les fragments de protéines virales synthétisés au laboratoire. Ainsi, nous pouvons savoir si vos globules blancs reconnaissent les fragments utilisés. Nous comparerons les résultats que nous obtiendrons de l'étude de votre sang à ceux obtenus avec d'autres volontaires. Nous espérons que les résultats obtenus durant cette étude pourront nous permettre d'identifier des peptides qui seront utilisées pour la mise au point de vaccin contre toutes les souches de VIH.

Risques et malaises

Les complications qui peuvent survenir pendant la prise du sang sont très rares. Néanmoins, quand elles arrivent, elles consistent en:

- des légers maux de tête,
- du gonflement du point de piqûre,
- des ecchymoses, du saignement ou de l'infection du même point de piqûre,
- un évanouissement

Les instruments utilisés dans la prise de sang sont des instruments à usage unique dont l'asepsie est garantie par le fabricant.

4. Bénéfices

Il n'y a pas vraiment de bénéfice direct pour votre participation à cette étude. Cependant l'information rassemblée pendant cette étude pourrait aider les chercheurs à développer un vaccin efficace contre le VIH.

5. Alternatives

Vous pouvez choisir de ne pas participer à cette étude. Votre docteur peut vous donner plus d'informations au sujet de votre maladie et des services disponibles.

6. Confidentialité

Toutes les informations obtenues pendant cette étude seront confidentielles. Elles seront sauvegardées selon les règles des institutions du Mali et de l'Université de Brown. Les résultats de recherche seront communiqués aux chercheurs et publiés dans des revues scientifiques. Par contre, votre nom et le fait que vous ayez participé à cette étude seront confidentiels. Les procédures assurant la confidentialité de votre participation comprennent l'identification de votre échantillon de sang seulement par un code mais pas par votre nom. Seuls les principaux investigateurs (Prof. Anatole Tounkara, Dr Soukalo Dao et Dr Souleymane Diallo) auront accès à l'identification de ce code.

7. Utilisation future de vos échantillons

Nous allons avec votre accord conserver une partie des échantillons que nous allons collecter au cas où il y aurait des analyses additionnelles à faire

FICHE SIGNALITIQUE

FICHE SIGNALÉTIQUE :

Nom: Dabitao

Prénom: Djénéba Koumba

Titre: ETUDE DES EPITOPES-T IMMUNOGENES POUR LA MISE AU POINT D'UN VACCIN ANTI-VIH-1.

Année Académique : 2003-2004

Nationalité : Malienne

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la Faculté de Médecine d'Odonto-Stomatologie de Bamako.

Secteur d'intérêt : Recherche Vaccinale et Biologie Moléculaire.

Résumé : Vingt ans après la description du SIDA, la réponse à médiation cellulaire (CD4+, CD8+) constitue aujourd'hui l'espoir pour mettre au point un vaccin global contre toutes les souches du VIH-1. L'Obstacle majeur du développement d'un tel vaccin est la grande diversité génétique du virus et le polymorphisme des gènes du HLA.

Cette étude prospective menée entre Août 2003 et Avril 2004 avait pour objectif d'évaluer la réponse immunitaire cellulaire induite par des épitopes (au nombre de 30 obtenus par des outils de Bioinformatiques) chez les donneurs bénévoles de sang.

Notre échantillon était constitué 35 donneurs dont 30 séropositifs au VIH et 5 donneurs séronégatifs. Parmi les 30 épitopes testés 83,33% induisait la libération d'INF- γ chez au moins un de nos sujets d'étude séropositifs. Les peptides de Classe II (CD4+) ont été reconnus par 53,33% des donneurs VIH positifs. Par contre nos sujets ont moins reconnu les peptides A3 de Classe I (CD8+), seulement 18,18%. Les peptides conçus à partir de Gag et Pol étaient les plus immunogènes. Il y avait un chevauchement dans les séquences des deux épitopes de Gag les plus reconnus par nos sujets d'étude (HIV_VAX_GAG_1043 et HIV_VAX_GAG_1044) c'est à dire qu'ils partageaient entre eux un motif qui pourrait être à l'origine de leur immunogénicité.

Mots clés : VIH, Vaccin, Epitopes

Contact: dkdabitao@yahoo.fr

SERMENT DE GALIEN

* * * * *

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des
conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon
art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur
enseignement ;

d'exercer dans l'intérêt de la santé publique, ma profession
avec conscience et de respecter non seulement la législation en
vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du
désintéressement ;

de ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers
le malade et sa dignité humaine ;

en aucun cas , je ne consentirai à utiliser mes connaissances
et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes
criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à
mes promesses !

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères
si j'y manque !