

MINISTÈRE DE L'ÉDUCATION

UNIVERSITÉ DE BAMAKO

REPUBLIQUE DU MALI

UN PEUPLE - UN BUT - UNE FOI

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PHARMACIE ET D'ODONTOSTOMATOLOGIE

Année universitaire : 2005-2006

No :

THESE

En vue de l'obtention du grade de
DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'État)

**GENOTYPAGE ET EXPLORATION DU POLYMORPHISME
NUCLEOTIDIQUE DE CCR5, RECEPTEUR DE CHIMIOKINES
ET CORECEPTEUR MAJEUR DU VIH-1, A BAMAKO**

Présentée par
KARIM COULIBALY

Soutenue publiquement le 15 Juillet 2006

JURY

- ◆ Président : Professeur Anatole TOUNKARA
- ◆ Membre : Docteur Seydou DOUMBIA
- ◆ Membre : Docteur Soukalo DAO
- ◆ Directeur de thèse: Docteur Ousmane A. KOITA

Les travaux ont été réalisés au Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée (FAST/Université de Bamako)
Avec le soutien du NIAID/NIH (USA) et de Tulane University (New Orleans, USA)

RÉPUBLIQUE DU MALI
MINISTÈRE DE L'ÉDUCATION
UNIVERSITÉ DE BAMAKO
FACULTÉ DE MÉDECINE DE PHARMACIE ET D'ODONTOSTOMATOLOGIE
Année universitaire : 2005-2006

THESE

En vue de l'obtention du grade de
DOCTEUR EN PHARMACIE (Diplôme d'État)

Titre :

**GENOTYPAGE ET EXPLORATION DU POLYMORPHISME
NUCLEOTIDIQUE DE CCR5, RECEPTEUR DE CHIMIOKINES
ET CORECEPTEUR MAJEUR DU VIH-1, A BAMAKO.**

Présentée par **KARIM COULIBALY**

Soutenue publiquement Samedi, le 15 Juillet 2006

JURY

- | | |
|-------------------------------|-----------------------------|
| ❖ Président : | Professeur Anatole TOUNKARA |
| ❖ Membre : | Docteur Seydou DOUMBIA |
| ❖ Membre : | Docteur Sounkalo DAO |
| ❖ Directeur de thèse : | Docteur Ousmane A. KOITA |

FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE

ANNEE UNIVERSITAIRE 2005-2006

ADMINISTRATION

DOYEN:

Anatole TOUNKARA

Professeur

1^{er} ASSESSEUR:

Drissa DIALLO

MAITRE DE CONFERENCES AGREGÉ

2^{ème} ASSESSEUR:

Sékou SIDIBE

MAITRE DE CONFERENCES

SECRETAIRE PRINCIPAL:

Yénimegue Albert DEMBELE

Professeur

AGENT COMPTABLE:

Mme COULIBALY Fatoumata TALL

CONTROLEUR DES FINANCES

PROFESSEURS HONORAIRES

Mr Alou BA

Ophthalmologie

Mr Bocar SALL

Orthopédie – Traumatologie - Secourisme

Mr Souleymane SANGARE

Pneumo-phthisiologie

Mr Yaya FOFANA

Hématologie

Mr Mamadou L. TRAORE

Chirurgie Générale

Mr Balla COULIBALY

Pédiatrie

Mr Mamadou DEMBELE

Chirurgie Générale

Mr Mamadou KOUMARE

Pharmacognosie

Mr Ali Nouhoum DIALLO

Médecine interne

Mr Aly GUINDO

Gastro-entérologie

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT PAR D.E.R. & PAR GRADE

▪ **D.E.R. CHIRURGIE ET SPECIALITES CHIRURGICALES**

1. PROFESSEURS

Mr Abdel Karim KOUMARE

Chirurgie Générale

Mr Sambou SOUMARE

Chirurgie Générale

Mr Abdou Alassane TOURE

Orthopédie - Traumatologie, **Chef de D.E.R.**

Mr Kalilou OUATTARA

Urologie

Mr Amadou DOLO

Gynéco Obstétrique

Mr Alhousseini Ag MOHAMED

ORL

Mme SY Assitan SOW

Gynéco-Obstétrique

Mr Salif DIAKITE

Gynéco-Obstétrique

Mr Abdoulaye DIALLO Anesthésie-Réanimation

2. MAÎTRES DE CONFÉRENCES AGREGÉS

Mr Abdoulaye DIALLO Ophtalmologie
Mr Djibril SANGARE Chirurgie Générale
Mr Abdel Kader TRAORE dit DIOP Chirurgie Générale
Mr Gangaly DIALLO Chirurgie Viscérale
Mr Mamadou TRAORE Gynéco-Obstétrique

3. MAÎTRES DE CONFÉRENCES

Mr Filifing SISSOKO Chirurgie Générale
Mr Sekou SIDIBE Orthopédie-Traumatologie
Mr Abdoulaye DIALLO Anesthésie-Réanimation
Mr Tieman COULIBALY Orthopédie-Traumatologie
Mme TRAORE J THOMAS Ophtalmologie
Mr Mamadou L. DIOMBANA Stomatologie

4. MAÎTRES ASSISTANTS

Mme DIALLO Fatimata S. DIABATE Gynéco-Obstétrique
Mr Sadio YENA Chirurgie Générale
Mr Issa DIARRA Gynéco-Obstétrique
Mr Youssouf COULIBALY Anesthésie-Réanimation
Mr Samba Karim TIMBO ORL
Mme TOGOLA Fanta KONIPO ORL
Mr Zimogo Zié SANOGO Chirurgie Générale

5. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Mr Nouhoum ONGOÏBA Anatomie & Chirurgie Générale
Mr Zanafon OUATTARA Urologie
Mr Adama SANGARE Orthopédie- Traumatologie
Mr Sanoussi BAMANI Ophtalmologie
Mr Doulaye SACKO Ophtalmologie
Mr Ibrahim ALWATA Orthopédie - Traumatologie
Mr Lamine TRAORE Ophtalmologie
Mr Mady MAKALOU Orthopédie/ Traumatologie
Mr Aly TEMBELY Urologie
Mr Niani MOUNKORO Gynécologie/ Obstétrique
Mme Djénéba DOUMBIA Anesthésie / Réanimation
Mr Tiémoko D. COULIBALY Odontologie
Mr Souleymane TOGORA Odontologie
Mr Mohamed KEITA ORL
Mr Bouraïma MAIGA Gynécologie/ Obstétrique

▪ **D.E.R. DE SCIENCES FONDAMENTALES**

1. PROFESSEURS

Mr Daouda DIALLO	Chimie Générale & Minérale
Mr Siné BAYO	Anatomie-Pathologie-Histoembryologie
Mr Amadou DIALLO	Biologie
Mr Moussa HARAMA	Chimie Organique
Mr Ogobara DOUMBO	Parasitologie-Mycologie
Mr Yénimégué Albert DEMBELE	Chimie Organique
Mr Anatole TOUNKARA	Immunologie - Chef de D.E.R.
Mr Bakary M. CISSE	Biochimie
Mr Abdrahamane S. MAÏGA	Parasitologie
Mr Adama DIARRA	Physiologie
Mr Massa SANOGO	Chimie Analytique

2. MAÎTRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Amadou TOURE	Histoembryologie
Mr Flabou BOUGOUDOGO	Bactériologie – Virologie
Mr Amagana DOLO	Parasitologie

3. MAÎTRES DE CONFERENCES

Mr Mamadou KONE	Physiologie
Mr Mahamadou CISSE	Biologie
Mr Sékou F. M. TRAORE	Entomologie médicale
Mr Abdoulaye DABO	Malacologie – Biologie Animale
Mr Ibrahim I. MAÏGA	Bactériologie – Virologie

4. MAÎTRES ASSISTANTS

Mr Abdrahamane TOUNKARA	Biochimie
Mr Moussa Issa DIARRA	Biophysique
Mr Kaourou DOUCOURE	Biologie
Mr Bouréma KOURIBA	Immunologie
Mr Souleymane DIALLO	Bactériologie/ Virologie
Mr Cheick Bougadari TRAORE	Anatomie pathologie
Mr Lassana DOUMBIA	Chimie Organique
Mr Mounirou Baby	Hématologie
Mr Mahamadou A Théra	Parasitologie

5. ASSISTANTS

Mr Mangara M. BAGAYOKO	Entomologie-Moléculaire Médicale
Mr Guimogo DOLO	Entomologie-Moléculaire Médicale
Mr Abdoulaye TOURE	Entomologie-Moléculaire Médicale
Mr Djbril SANGARE	Entomologie-Moléculaire Médicale
Mr Mouctar DIALLO	Biologie/ Parasitologie
Mr Boubacar TRAORE	Immunologie
Mr Bocary Y Sacko	Biochimie

D.E.R. DE MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES

1. PROFESSEURS

Mr Abdoulaye Ag RHALY	Médecine Interne
Mr Mamadou K. TOURE	Cardiologie
Mr Mahamane MAÏGA	Néphrologie
Mr Baba KOUMARE	Psychiatrie- Chef de D.E.R.
Mr Moussa TRAORE	Neurologie
Mr Issa TRAORE	Radiologie
Mr Mamadou M. KEITA	Pédiatrie
Mr Hamar A. TRAORE	Médecine Interne
Mr Dapa Aly DIALLO	Hématologie
Mr Moussa Y. MAIGA	Gastro-entérologie-Hépatologie
Mr Somita KEITA	Dermato-Léprologie

2. MAÎTRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Toumani SIDIBE	Pédiatrie
Mr Bah KEITA	Pneumo-Phtisiologie
Mr Boubacar DIALLO	Cardiologie
Mr Abdel Kader TRAORE	Médecine Interne
Mr Siaka SIDIBE	Radiologie
Mr Mamadou DEMBELE	Médecine Interne

3. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Mamady KANE	Radiologie
Mr Sahare FONGORO	Néphrologie
Mr Bakoroba COULIBALY	Psychiatrie
Mr Bou DIAKITE	Psychiatrie
Mr Bougouzié SANOGO	Gastro-entérologie

4. MAITRES ASSISTANTS

Mme Tatiana KEITA	Pédiatrie
Mme TRAORE Mariam SYLLA	Pédiatrie
Mr Adama D. KEITA	Radiologie
Mme SIDIBE Assa TRAORE	Endocrinologie
Mme Habibatou DIAWARA	Dermatologie
Mr Daouda K Minta	Maladies Infectieuses

5. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Mr Kassoum SANOGO	Cardiologie
Mr Seydou DIAKITE	Cardiologie
Mr Mahamadou B. CISSE	Pédiatrie
Mr Arouna TOGORA	Psychiatrie
Mme Diarra Assétou SOUCKO	Médecine interne
Mr Boubacar TOGO	Pédiatrie
Mr Mahamadou TOURE	Radiologie
Mr Idrissa A. CISSE	Dermatologie

Mr Mamadou B. DIARRA	Cardiologie
Mr Anselme KONATE	Hépatogastro-entérologie
Mr Moussa T. DIARRA	Hépatogastro-entérologie
Mr Souleymane DIALLO	Pneumologie
Mr Souleymane COULIBALY	Psychologie
Mr Sounkalo DAO	Maladies infectieuses
Mr Cheick Oumar Guinto	Neurologie

▪ **D.E.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

1. PROFESSEURS

Mr Boubacar Sidiki CISSE	Toxicologie
Mr Gaoussou KANOUTE	Chimie Analytique Chef de D.E.R

2. MAÎTRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Drissa DIALLO	Matières médicales
Mr Ousmane DOUMBIA	Pharmacie Chimique

3. MAÎTRES DE CONFERENCES

Mr Boulkassoum Haidara	Législation
Mr Elimane MARIKO	Pharmacologie

4. MAÎTRES ASSISTANTS

Mr Benoît KOUMARE	Chimie analytique
Mr Alou KEITA	Galénique
Mr Ababacar I. MAÏGA	Toxicologie
Mr Yaya KANE	Galénique
Mne Rokia SANOGO	Pharmacognosie

5. ASSISTANTS

Mr Saibou MAIGA	Législation
Mr Ousmane KOITA	Parasitologie Moléculaire

▪ **D.E.R. SANTE PUBLIQUE**

1. PROFESSEUR

Mr Sidi Yaya SIMAGA	Santé Publique Chef de D.E.R
Mr Sanoussi KONATE	Santé Publique

2. MAÎTRE DE CONFERENCES AGREGE

Mr Moussa A. MAÏGA	Santé Publique
--------------------	----------------

3. MAÎTRES ASSISTANTS

Mr Bocar G. TOURE	Santé Publique
Mr Adama DIAWARA	Santé Publique
Mr Hamadoun SANGHO	Santé Publique
Mr Massambou SACKO	Santé Publique

Mr Alassane A. DICKO

Santé Publique

4. ASSISTANTS

Mr Samba DIOP

Anthropologie Médicale

Mr Seydou DOUMBIA

Epidémiologie

Mr Oumar THIERO

Biostatistique

▪ **CHARGES DE COURS & ENSEIGNANTS VACATAIRES**

Mr N'Golo DIARRA

Botanique

Mr Bouba DIARRA

Bactériologie

Mr Salikou SANOGO

Physique

Mr Boubacar KANTE

Galénique

Mr Souleymane GUINDO

Gestion

Mme DEMBELE Sira DIARRA

Mathématiques

Mr Modibo DIARRA

Nutrition

Mme MAÏGA Fatoumata SOKONA

Hygiène du Milieu

Mr Mahamadou TRAORE

Génétique

Mr Yaya COULIBALY

Législation

Mr Lassine SIDIBE

Chimie-Organique

▪ **ENSEIGNANTS EN MISSION**

Pr. Doudou BA

Bromatologie

Pr. Babacar FAYE

Pharmacodynamie

Pr. Eric PICHARD

Pathologie Infectieuse

Pr. Mounirou CISSE

Hydrologie

Pr. Amadou Papa DIOP

Biochimie

DÉDICACES
ET
REMERCIEMENTS

Dédicaces

Au nom de Dieu le très miséricordieux, le tout miséricordieux.

➤ *A mes Parents*

Vous m'avez toujours accordé votre Soutien et votre amour. Vous m'avez éduqué avec les valeurs de respect de soi, de responsabilité et d'amour du prochain. Vous avez supporté mes nombreux caprices. Vous rendre fiers de moi constitue ma priorité.

Maman Kourby, Tonton Yaya, Tantie Diénéba.

Qu'Allah le tout puissant vous accorde éternellement sa miséricorde infinie.

➤ *A ma famille,*

Je vous dédie ce travail avec tout mon amour. Qu'Allah vous protège.

Balôgô,

Papa Kanaté, Nounou, Papou, Iblo...

Tonton Abou, Tonton Bilo, Tantie 'maman', Tonton Blacky, Tantie Ahoua.

Sarah, Lika, Ballous, Katier, Masseni, Ismobil, Tiabaga, Adja, Kito.

➤ *A mes ami(e)s*

Guiré, Yacoub Ouatt...

Fof, Titi, Oumou, Bazo, Diaby Daou, Solo, Kara...

Tim et Mariam, Marianne, Naft, Hamsa, Abou Guindo...

Ousmane Ladji, Sir Cool, Veron, Guy-Martiale...

Abba, Aita, Sory...

C'est un grand honneur pour moi d'être votre ami. Quelque chose de particulier me lie à chacun d'entre vous ; Exprimons le cœur à cœur...

A tous ceux que j'ai omis de citer dans l'enthousiasme, je vous prie d'accepter mes excuses pour cette omission involontaire.

C'est de tout mon cœur que je vous dédie ce travail.

A la mémoire de :

*Feu mon grand père chéri, <<K.A.>>
Tu me manques beaucoup. Qu'Allah t'héberge dans son Paradis. (Amine)*

Et de :

*Feu le Professeur Arouna Keita.
Vous m'avez soutenu et aidé à une étape décisive de ma vie.
Que la terre vous soit légère.
Qu'Allah bénisse votre famille.*

Remerciements

- ✦ *A la famille de feu le Pr Arouna Keita*
- ✦ *A Mr et Mme Koumaré (Ibrahim et Nafi)*
- ✦ *Au Docteur Ibrahima KOITA*
- ✦ *Au Docteur Aliou Sissako*
- ✦ *Au Docteur Ousmane Koita*
- ✦ *Au Docteur Ousmane Hamadoun Cissé*
- ✦ *Au Docteur Ibrah Mahamadou*
- ✦ *A Mr Touré Amidou à Boulkassoumbongou*
- ✦ *Aux étudiants ivoiriens à Bamako (au point G et à la FAST)*
- ✦ *A tous les jaycees du Mali, ceux de l'OMS Bamako espoir particulièrement*
- ✦ *A Mr Bamba et Donald de Afimex.*
- ✦ *A l'Association des élèves et étudiants musulmans de Côte d'Ivoire*
- ✦ *A tout le personnel du LBMA ainsi que les stagiaires, les internes les auditeurs de DEA
(Particulièrement à Tantie Kadi, Fabla, Madou, Bako, et Rabi)*
- ✦ *A mes collègues de promotion et de thèse (Abba, Penda, Cheick, Zibo, Aissata, Hadiza,
Mouki)*
- ✦ *Au stagiaire de l'unité de virologie moléculaire du LBMA*

**HOMMAGES
AUX MEMBRES
DU JURY**

Hommages aux membres du jury

A notre maître et Président du jury

Professeur Anatole Toumkara

- Professeur d'Immunologie
- Chef de D.E.R de Sciences fondamentales de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie.
- Directeur du programme NIH/NIAID/FMPOS de recherche sur le SIDA et la Tuberculose.
- Doyen de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie de L'Université de Bamako.

Honorable Maître,

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider ce jury malgré vos multiples sollicitations. Vos connaissances scientifiques ainsi que vos qualités humaines forcent l'admiration et le respect. Recevez l'expression de notre profonde gratitude.

A notre maître et juge

Docteur Seydou Doumbia

- Docteur en Médecine et PhD en Epidémiologie.
- Assistant au D.E.R de Santé Publique de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie.
- Coordinateur du Cours international OMS sur la génomique fonctionnelle des vecteurs

Vous nous faites honneur en acceptant de juger ce travail. Votre rigueur scientifique et votre disponibilité sont remarquables. Recevez l'expression de notre très haute considération.

A notre maître et juge

Docteur Soukalo D.A.O

- Médecin Spécialiste en Maladies infectieuses et tropicales.
- Praticien Hospitalier, Assistant chef de clinique.
- Chargé de cours de Pathologie Infectieuse à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie.
- Clinicien du programme NIH/NIAID/FMPOS de recherche sur le SIDA et la Tuberculose.

Nous ne savons combien vous remercier pour avoir bien voulu juger ce travail. Clinicien émérite, Votre constante disponibilité et votre simplicité nous ont beaucoup marqués. Veuillez accepter nos remerciements les plus sincères.

A notre Maître et Directeur de thèse.

Docteur Ousmane Koita

- Docteur en Pharmacie et PhD en Parasitologie Moléculaire.
- Chargé de cours de Biologie Moléculaire à la FAST et de Biologie Animale à la FMPOS
- Responsable du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée de la FAST
- Directeur Adjoint du programme NIH/NIAID/FMPOS de recherche sur le SIDA et la Tuberculose.

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous avez fait en nous confiant ce travail. Vos qualités de chercheur ainsi que votre grande simplicité nous ont toujours impressionnés. A vos côtés, nous avons appris la patience et le goût de la recherche. Vous demeuré pour nous un modèle. Recevez cher maître l'expression de notre reconnaissance infinie.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONSvxii
TABLEAUX ET FIGURESvxiii
INTRODUCTION	1
1 OBJECTIFS	6
1.1 Objectif général	6
1.2 Objectifs spécifiques.....	6
2 GENERALITES	7
2.1 Infection à VIH/ SIDA	7
2.1.1 Définitions et classification.....	7
2.1.2 Epidémiologie.....	9
2.1.3 Virus de l'immunodéficience humaine.....	11
2.1.3.1 Historique de la découverte du VIH.....	11
2.1.3.2 Les Rétrovirus.....	13
2.1.3.2 Propriétés biologiques du VIH.....	14
2.1.3.2.1 Morphologie du VIH-1.....	14
2.1.3.2.2 Organisation génétique du VIH-1.....	16
➤ Les gènes classiques.....	16
➤ Les gènes supplémentaires.....	17
➤ Le génome du provirus.....	19
2.1.3.2.3 Cellules cibles et réservoirs cellulaires du VIH-1.....	20
2.1.3.2.4 Cycle de réplication du VIH-1	21
2.1.3.2.5 Stabilité physico-chimique	27
2.1.3.2.6 Variabilité génétique du VIH.....	27
2.1.3.2.7 Classification des VIH.....	27
2.1.3.3 Répartition géographique du VIH.....	29
2.1.4 Pouvoir pathogène du VIH-1.....	30
2.1.4.1 Histoire naturelle de l'infection à VIH/SIDA.....	30
2.1.4.2 Immunologie.....	33
2.1.4.3 Mode de transmission.....	33
2.1.4.4 Facteurs de progression.....	34
2.1.4.5 Particularités en zone tropical.....	35
2.1.5 Diagnostic biologique.....	36

2.1.5.1	Les méthodes de diagnostic indirect	36
2.1.5.2	Les techniques de diagnostic direct	40
2.1.5.3	diagnostic moléculaire	42
2.1.6	Traitement	43
2.1.6.1	Choix préférentiels d'antiviraux pour le traitement initial.....	45
2.1.6.2	Mécanisme de la résistance aux ARV	45
2.2	Terrain génétique de l'hôte et infection VIH/SIDA.....	46
2.2.1	Facteurs de l'évolution de l'infection par le VIH.....	46
2.2.1.1	Facteurs d'origine virale.....	46
2.2.1.2	Facteurs génétiques de l'hôte.....	47
2.2.1.3	Gènes impliqués dans la réponse immunitaire	47
2.2.2	Gènes impliqués dans l'interaction virus-cellules cibles.....	48
2.2.3	Les chimiokines et leurs récepteurs dans l'infection à VIH /SIDA.....	49
2.2.3.1	Engagement du co-récepteur dans l'interaction virus - cellules cibles.....	49
2.2.3.2	Phénotype du virus lié à l'utilisation du co-récepteur.....	49
2.2.3.3	Structure des récepteurs de chémokines.....	50
2.2.3.4	CCR5 et susceptibilité a l'infection à VIH/SIDA.....	53
➤	Génétique et clonage	53
➤	Fonction et expression.....	54
➤	Structure tridimensionnelle et site de fixation du ligand.....	54
➤	Mutation delta 32 de CCR5.....	54
➤	Epidémiologie moléculaire de la mutation Delta 32 de CCR5.....	58
➤	Autres polymorphisme de CCR5	59
➤	Application thérapeutique : Antagonistes de CCR5.....	59
2.3	Outils de biologie moléculaire	62
2.3.1	Extraction / Purification de ADN	62
2.3.2	Dosage et Conservation	62
2.3.3	Electrophorèse	63
2.3.4	Amplification in vitro du matériel génétique (PCR).....	64
2.3.4.1	Principe et concepts de base de la PCR.....	64
2.3.4.2	La réaction de PCR.....	65
2.3.4.3	Les variants de la PCR	68

2.3.4.4	Utilisations des produits PCR.....	68
2.3.4.5	Les limites de la PCR.....	69
2.3.5	Séquençage de l'ADN	69
2.3.5.1	Principe	69
2.3.5.2	La réaction du séquençage.....	70
2.4	Outils bioinformatique d'analyse des séquences D'ADN.....	72
2.4.1	Objet de la bioinformatique	72
2.4.2	Analyse de séquences d'ADN.....	73
2.4.3	Objet de l'alignement.....	73
2.4.4	Points essentiels d'un alignement.....	73
2.4.5	Différents types d'alignements.....	73
2.4.6	Applications pratiques de l'analyse des séquences.....	74
2.4.6.1	Recherche de similarités.....	74
2.4.6.2	Comparaison de plusieurs séquences (alignement multiple).....	75
3	MÉTHODOLOGIE.....	76
3.1	Cadre et lieu de l'étude	76
3.2	Type et période d'étude.....	76
3.3	Populations d'étude	76
3.4	Méthodes de l'étude.....	78
3.4.1	Marqueurs moléculaires utilisés.....	78
3.4.2	Matériel biologique.....	79
3.4.2.1	Isolement des cellules mononuclées du sang périphérique... ..	79
3.4.2.2	Extraction et quantification de l'ADN génomique.....	79
3.4.3	Génotypage de CCR5 par La PCR.....	80
3.4.3.1	Electrophorèse des produits de PCR	81
3.4.4.1	Séquençage automatique direct.....	82
3.4.5	Analyse des séquences.....	84
4	RESULTATS ET COMMENTAIRES.....	86
4.1	Résultats de la PCR de génotypage.....	86
4.2	Résultats du séquençage automatique Direct	89
4.2.2	Analyse des séquences	91
4.2.3	Analyses phylogénétiques	101

5-	DISCUSSION.....	105
	CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....	110
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	112
	ANNEXES.....	124
	FICHE SIGNALETIQUE DE LA THESE.....	134
	SERMENT DE GALIEN.....	135

ABBREVIATIONS

%	pourcentage	MIP1	Macrophage Inflammatory Protein
µl	microlitre	ml	millilitre
A	Adénine	mM	micro moles par litre
ADN	Acide désoxyribo nucleique	NCBI	National Center for Biotechnology Information
ARV	AntiRetroViraux	NIH	National Institute of Health
ADNc	ADN complémentaire	°C	Degré Celsius
ARN	Acide ribo nucleique	OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ATP	Adenine Tri Phosphate	Pb	Paire de base
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	PB	Primer binding site
C	Cytosine	PBMC	cellules mononuclées du sang périphérique
CCR2	C-C motif chemokines receptor 2	PBMCs	PBMCs = Peripheral Blood Monocyte Cells
CCR3	C-C motif chemokines receptor 3	PBS	Phosphate Buffered Saline
CCR5	C-C motif chemokines receptor 5	PCR	Polymerase chain reaction
CD	Cluster of Differentiation	PDB	Protein Data Bank
CDC	Centers for Diseases Control and prevention	PHA	phytohémmagglutinine A
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité	PTME	Prévention de la Transmission Mère Enfant
CNTS	centre national de transfusion sanguine	RANTE	Regulated on Activation, Normal T
CXCR4	C-X-C motif chemokines receptor 4	S	Expressed and Secreted
dA	désoxy Adenine	RIPA	Radio-Immuno Précipitation Assay
dC	désoxy Cytosine	RT	reverse transcriptase
DC-Sign	Dendritic-Cell Specific ICAM-3 grabbing nonintegrin.	s	Seconde
dCTP	di Cytosine Tri Phosphate	SCID	Severe Combined ImmunoDeficiency
ddA	didésoxy Adenine	SDF 1 1	Stromal Derived Factor 1
DDBJ	DNA Data Bank of Japan	SIDA	Syndrome d'Immuno Déficience Acquise
ddC	didésoxy Cytosine	SLS =	Sample Loading Solution
ddG	didésoxy Guanine	SNP	Single Nucleotide polymorphism
ddT	didésoxy Thymine	T	T = Thymine
dG	désoxy Guanine	tARN	ARN de transfert
dGTP	Guanine Tri Phosphate	TBE	Tris-Borate-EDTA
dT	désoxy Thymine	UV	Ultra violet
dTTP	di Thymine Tri Phosphate	V	volts
EBI	European Bioinformatique Institute	WB	Western blot
EDSM	Enquête Démographique de Santé du Mali	TNF	Tumor Necrosis Factor
ELISA	Enzyme linked Immuno Sorbent Assay		
EMBL	European Molecular Biology Laboratory		
EDTA	Ethylene Diamino Tetra Acétique		
FASTA	FAST All		
FeIV	Feline leukemia Virus :		
G	Guanine.		
GRID	Gay Related Immune Deficiency		
HGT	Hôpital Gabriel Touré.		
HLA	Human Leukocyte Antigen		
HNPG	Hôpital National du Point G		
HTLV	Human T-cell Leukemia Virus		
Kb	Kilo bases		
IFI	Immuno Fluorescence Indirect		
LAV	Lymphadenopathy Associated Virus		
LTR	Long Terminal Repeat		

TABLEAUX ET FIGURES

TABLEAU		Page
▪ TABLEAU I:	Classification en stades cliniques proposée par l'OMS.....	11
▪ TABLEAU II :	Épidémiologie mondiale du VIH/SIDA en fin 2005.....	13
▪ TABLEAU III :	Prévalence de l'infection à VIH par sexe et par région au Mali en 2001.....	15
▪ TABLEAU IV:	Techniques utilisant un deuxième anticorps marqué.....	44
▪ TABLEAU V:	Les récepteurs de chimiokines et leurs ligands chez l'homme.....	57
▪ TABLEAU VI:	Récepteurs de chimiokines et maladies humaines associées	57
▪ TABLEAU VII :	Epidémiologie moléculaire de la mutation CCR5Δ32	64
▪ TABLEAU VIII:	Séquence des amorces pour le génotypage de CCR5.....	84
▪ TABLEAU IX:	Réactifs de la PCR de génotypage de CCR5.....	86
▪ TABLEAU X:	Mélange réactionnel de la PCR de pré séquençage	88
▪ TABLEAU XI:	Génotypage de CCR5Δ32 à Bamako.....	94
▪ TABLEAU XII :	Séquences nucléotidiques de CCR5 obtenues à Bamako.	96
▪ TABLEAU XIII:	Similarités des séquences CCR5 Bamako avec les bases de donnée.....	97
▪ TABLEAU XIV:	Homologies des séquences CCR5 hpg (Malades du SIDA)	99
▪ TABLEAU XV:	Homologies des séquences CCR5cnts (HIV ⁺ Asymptomatiques).....	101
▪ TABLEAU XVI:	Homologies des séquences CCR5 hgt (Séronégatifs exposés)	103
▪ TABLEAU XVII:	Homologies des séquences CCR5 Bamako.....	105

- **Figure 1** : Structure morphologique du VIH-1.....22
- **Figure 2** : Représentation schématique du génome du VIH-1.....27
- **Figure 3** : Mécanisme d’entrée du VIH dans les cellules cibles.....29
- **Figure 4** : Cycle de réplication du VIH-133
- **Figure 5** : Histoire naturelle de l’infection à VIH/SIDA39
- **Figure 6** : Carte génétique du gène des récepteurs de chémokines sur le chromosome 3
humain60
- **Figure 7** : Portion du gène *CCR5* et séquence aminoacide avec la délétion $\Delta 32$ 63
- **Figure 8** : Structures prévisionnelles de *CCR5*64
- **Figure 9** : Principe de PCR.....72
- **Figure 10**: Mécanisme de la réaction de PCR74
- **Figure 11**: Principe du séquençage de l’ADN.....78
- **Figure 12** : Fonctionnement du séquenceur capillaire.....79
- **Figure 13** : Schématisation de la démarche méthodologique.....92
- **Figure 14 a** : Gel d’agarose à 2% montrant l’amplification de *CCR5*.....93
- **Figure 14 b** : Analyse de gel d’agarose avec Kodak EDAS 290 1D version3.5.4.....94
- **Figure 15**: Alignement multiple des séquences *CCR5*hpg (Malades du SIDA).....99
- **Figure 16** : Alignement multiple des séquences *CCR5*cnts(HIV+ Asymptomatiques)..101
- **Figure17** : Alignement multiple des séquences *CCR5*hgt (séronégatifs)103
- **Figure 18** : Alignement multiple des séquences *CCR5* Bamako105
- **Figure 19** : Phylogramme des séquences *CCR5*hpg108
- **Figure 20** : Phylogramme des séquences *CCR5*cnts109
- **Figure 21** :Phylogramme des séquences *CCR5*hgt.....110
- **Figure 22** : Phylogramme des séquences *CCR5* Bamako111

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La pandémie du SIDA, véritable problème de santé publique, constitue une menace directe à la survie des populations à travers le monde. Selon le rapport ONUSIDA de fin 2005, 40,3 millions de personnes vivraient avec le VIH, 3,1 millions de décès seraient imputables au SIDA et l'Afrique reste encore le continent le plus touché avec en prime une féminisation galopante de l'infection. De la biologie à la clinique en passant par l'épidémiologie et la thérapeutique, les efforts de la communauté scientifique ont abouti à une meilleure compréhension de la pathogenèse de l'infection et à une prise en charge en constante progression. Au niveau biologique, l'évolution de l'infection semble liée à deux types de facteurs indissociables à savoir des facteurs virologiques (spécificités des souches virales) et des facteurs relatifs au terrain génétique de l'hôte (Mutations des corécepteurs, profil des haplotypes HLA...).

Ainsi l'encrage du VIH aux cellules cibles est réalisé par la médiation entre des séquences spécifiques de sa glycoprotéine d'enveloppe gp120 et la molécule CD4 qui physiologiquement est un récepteur pour les molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH ou HLA)(1, 2).

Cependant, cette condition, bien que nécessaire, demeure insuffisante pour l'entrée complète du virus dans les cellules de l'hôte. En effet, des observations montrent que le VIH ne peut se répliquer efficacement dans des cellules exprimant le CD4 seul de même que dans les cellules animales transgéniques pour le CD4 humain; D'où l'hypothèse d'un récepteur additionnel (3). La découverte des co-récepteurs majeurs pour l'entrée du VIH tels CCR5 et CXCR4, récepteurs de chimiokines par nature, a finalement confirmé ces observations (4). D'autres récepteurs tels CCR2 et CCR3 fonctionneraient comme des co-récepteurs mineurs (4).

Les récepteurs de chimiokines sont en fait des glycoprotéines de la surface cellulaire à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G **(5,6)** ; leur liaison aux chimiokines assure la médiation du chimiotactisme des cellules lymphocytaires et des macrophages vers les lieux de l'inflammation. Les chimiokines joueraient aussi un rôle de contrôle dans la prolifération et la différenciation de la lignée granulocytaire **(7)**. Ainsi le récepteur CCR5 fixe les chimiokines RANTES, MIP1 α , MIP1 β alors que CXCR4 fixe la chimiokine SDF1.

L'usage des co-récepteurs est intimement lié au tropisme viral (phénotype du virus). Les souches virales généralement impliquées dans les primo-infections sont de tropisme R5 et utilisent CCR5 ou CCR2 exprimé sur les macrophages, les cellules muqueuses et dendritiques. Ces souches, encore nommées M-Tropiques ou monocytootropes, sont dites primaires **(8)**. Les souches virales tardives qui apparaissent par adaptation longtemps après la primo-infection sont de tropisme X4 (T-Tropiques) car elles utilisent CXCR4 exprimé sur les cellules T. Ces souches plus cytopathogènes que les R5 car inductrices de syncytia (SI), précipitent la déplétion des cellules T et le déclenchement véritable du SIDA clinique **(8)**. Au cours de l'infection on note aussi l'apparition de virus de tropisme double (R5 X4) qui serait une adaptation virale transitoire pour une utilisation massive des co-récepteurs. Cette dualité du tropisme viral est une étape cruciale dans l'accélération de la progression vers le SIDA **(9)**.

Une des conséquences majeures de la découverte du rôle crucial des co-récepteurs dans l'infection à VIH fut l'observation selon laquelle certaines personnes demeureraient non infectées malgré de multiples expositions au virus **(10-12)**. Il a été démontré que les cellules T CD4⁺ de ces individus sont très résistantes *in vitro* à l'entrée des virus primaires de tropisme R5 mais sont facilement infectées par des virus transformés de lignée cellulaire T et de tropisme

X4 **(13)**. L'exploration génétique des co-récepteurs majeurs chez ces sujets a mis en évidence une délétion de 32 paires de bases dans le gène de CCR5 avec pour conséquence directe l'expression à la surface des cellules d'une protéine CCR5 tronquée qui s'internalise au niveau transmembranaire, empêchant de ce fait la fixation du virus **(14-15)**. L'état homozygote de la délétion serait associé à une résistance quasi-totale à l'infection par les souches virales R5 alors que l'état hétérozygote, sans inhiber l'infection, serait plutôt associé à un retard de progression vers le SIDA **(16)**. L'estimation de la fréquence de l'allèle muté dans diverses populations montre de grandes disparités ethnico raciales. Ainsi chez les populations caucasiennes, on aurait environ 15% d'hétérozygotes pour 1% d'homozygotes alors qu'il serait virtuellement rare chez les personnes d'origines africaine et asiatique **(16)**.

Des mutations au niveau des allèles promoteurs de CCR5 (CCR5 P1-P4) seraient à un niveau moindre associées à un pronostic d'évolution de l'infection plutôt défavorable **(1)**.

Une mutation de type SNP (Single Nucleotide polymorphism) dite m303 a aussi été décrite. Elle serait responsable de résistance chez des non porteurs de la mutation delta 32 par introduction d'un codon « stop » dans la séquence transcrite de CCR5 empêchant ainsi l'expression cellulaire d'un récepteur fonctionnel **(17)**.

Dans une récente étude (2004), des variants de CCR5 non décrits auparavant, ont été mis évidence en Asie du sud-est chez des porteurs de l'allèle CCR5 sauvage. Ces variants seraient responsables d'une réduction fonctionnelle du corécepteur **(18)**. Contrairement au récepteur CCR5 aucune mutation génétique de CXCR4 n'est pour l'instant associée à une résistance à l'infection **(1)**.

Un autre polymorphisme décrit sur le co-récepteur mineur CCR2 serait impliqué dans le ralentissement de la progression de l'infection vers le SIDA.

Il s'agit d'une substitution d'une valine par une isoleucine en position 64 dans le premier domaine transmembranaire du dit récepteur **(1,2)**.

En ce qui concerne les chimiokines, une mutation de type SNP dans le gène de SDF1, ligand physiologique de CXCR4, a été décrite comme ayant un rôle de potentialisation des effets protecteurs de CCR5 et CCR2 **(1)**.

Ainsi les corécepteurs sont rapidement devenus des cibles clés de la recherche sur les fondements génétiques de la pathogenèse du VIH/SIDA. Les effets de leurs polymorphismes génétiques constituant des axes prometteurs dans la compréhension des phénomènes de résistance et de susceptibilité naturelles; de même que dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques.

En dehors des chimiokines et leurs récepteurs, Certains haplotypes HLA agiraient sur la progression de l'infection par effets combinés de plusieurs systèmes d'allèles. On distinguerait des haplotypes de résistance (HLA-A1, A2, B14, B17, B27) et de susceptibilité (HLA-B35, DR1, DR3, DQ1).

Malgré tout, la mutation delta 32 de CCR5 demeure le polymorphisme génétique le plus significativement associé à une résistance naturelle absolue à l'infection par le VIH. Néanmoins, des phénomènes de résistance à l'infection par le VIH-1 chez des non porteurs de la mutation delta 32 suggère l'implication probable d'autres polymorphismes de CCR5 qu'il serait important d'explorer et de caractériser. **(1,18)**

Les techniques de biologie moléculaire et la bioinformatique offrent de larges opportunités pour l'analyse et l'exploration des gènes. Les polymorphismes génétiques responsables de changements phénotypiques significatifs peuvent ainsi être aisément identifiés, caractérisés et évalués.

Dans cette étude menée à Bamako (MALI), l'allèle de résistance CCR5 Δ 32 a été génotypé chez des sujets africains discriminés selon leur statut VIH/SIDA.

L'évaluation du polymorphisme nucléotidique des séquences d'une portion du gène *CCR5* couvrant le site de la mutation $\Delta 32$ a aussi été effectuée.

La PCR (Polymerase Chain Reaction) et le séquençage automatique direct par capillarité associés aux outils bioinformatiques d'analyse de séquences nucléotidiques furent utilisés comme techniques d'étude.

OBJECTIFS

2. OBJECTIFS

1.1 Objectif général

Etudier le polymorphisme génétique de CCR5, récepteur de chimiokines et corécepteur majeur du VIH- 1 à Bamako.

2.2 Objectifs spécifiques

- Déterminer le génotype des sujets inclus dans l'étude pour l'allèle de résistance naturelle $CCR5\Delta32$ par la Polymerase Chain Reaction (PCR)
- Déterminer les séquences nucléotidiques d'une portion du gène $CCR5$ contenant le site de la délétion $\Delta32$ chez 5% des sujets inclus dans l'étude par le séquençage automatique direct.
- Rechercher la similarité des séquences obtenues à Bamako avec celles des banques de données génomiques internationales.
- Evaluer le polymorphisme nucléotidique.

GÉNÉRALITÉS

3 GENERALITES

2.2 Infection à VIH et SIDA

2.2.1 Définitions et classifications

Le Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise (SIDA) est la maladie provoquée par le virus de l'immunodépression humaine, le VIH-1 et ou le VIH-2. La première définition de l'infection à VIH/SIDA fut établie en 1982 par le CDC **(19)**.

Elle reprenait en grande partie les manifestations observées chez les premiers patients d'une part et les observations rapportées au cours d'affections en relation avec ce nouveau phénomène d'autre part.

La mise en évidence en 1983 du VIH- 1 et le développement d'une technique de sérologie fiable dès 1985 ont permis d'élargir cette définition et en tirer une seconde **(20)**. Les deux premières définitions impliquant des moyens pas toujours disponibles dans les pays en voie de développement (PVD) et particulièrement les pays africains, une définition dite de Bangui fut élaborée en 1986 à leur intention **(21)**. En 1987, la nécessité d'avoir une définition unique, emmena le CDC et l'OMS à élaborer une troisième **(22)**.

Ces définitions, utiles pour l'épidémiologie, aboutirent notamment à différentes classifications cliniques répartissant les patients par groupes homogènes.

On distingue ainsi :

- La classification CDC de 1986 **(23)** et sa révision de 1993 qui répartit les patients en quatre groupes s'excluant mutuellement. La révision distingue trois catégories cliniques **(24,25)**.
- La classification OMS de 1990 qui classe les patients en quatre stades cliniques de gravité croissante **(26)**.

TABLEAU I: Classification en stades cliniques proposée par l'OMS (26)

Stade clinique 1 :

- 1- Patient asymptomatique.
 - 2- Adénopathie persistante généralisée.
- Degré d'activité 1 : patient asymptomatique, activité normale.

Stade clinique 2 :

- 3- Perte de poids inférieure à 10 % du poids corporel.
 - 4- Manifestations cutanéomuqueuses mineures (dermatites séborrhéiques, prurigo, atteinte fongique des ongles, ulcérations buccales récurrentes supérieures, chéilite angulaire
 - 5- Zona, au cours des 5 dernières années.
 - 6- Infections récidivantes des voies respiratoires supérieures (sinusite bactérienne, par exemple).
- Et/ou* degré d'activité 2 : patient symptomatique, activité normale.

Stade clinique 3 :

- 7- Perte de poids supérieure à 10 % du poids corporel.
 - 8- Diarrhée chronique inexplicée pendant plus de 1 mois.
 - 9- Fièvre prolongée inexplicée (intermittente ou constante) pendant plus de 1 mois.
 - 10- Candidose buccale.
 - 11- Leucoplasie chevelue buccale.
 - 12- Tuberculose pulmonaire, dans l'année précédente.
 - 13- Infections bactériennes sévères (pneumopathie, pyomyosite, par exemple).
- Et/ou* degré d'activité 3 : patient alité moins de la moitié de la journée pendant le dernier mois.

Stade clinique 4 :

- 14- Syndrome cachectisant du VIH, selon la définition des CDC.
- 15- Pneumopathie à *Pneumocystis carinii*.
- 16- Toxoplasmose cérébrale.
- 17- Cryptosporidiose, accompagnée de diarrhée, pendant plus de 1 mois.
- 18- Cryptococcose extra pulmonaire.
- 19- Cytomégalovirose (CMV) touchant un autre organe que le foie, la rate ou les ganglions lymphatiques.
- 20- Herpès cutanéomuqueux pendant plus de 1 mois ou viscéral quelle qu'en soit la durée.
- 21- Leuco-encéphalopathie multiforme progressive.
- 22- Toute mycose endémique généralisée (histoplasmose, coccidioïdomycose, par exemple).
- 23- Candidose de l'oesophage, de la trachée, des bronches ou des poumons.
- 24- Mycobactériose atypique, généralisée.
- 25- Septicémie à salmonelles non typiques.
- 26- Tuberculose extra pulmonaire.
- 27- Lymphome.
- 28- Sarcome de Kaposi (SK).
- 29- Encéphalopathie à VIH, selon la définition des CDC. *Et/ou* degré d'activité 4 : patient alité plus de la moitié de la journée pendant le dernier mois

2.2.2 Epidémiologie

Selon l'ONU SIDA/OMS, le nombre de personnes vivant avec le VIH/SIDA en fin 2005 était de 40,3 millions (36,7- 45,3 millions) avec 4,9 millions (4,3-6,6 millions) de nouveaux cas d'infection et 3,1 millions de décès (2,8 – 3,6 millions).

Le nombre de personnes vivant avec le VIH a augmenté dans toutes les régions, par rapport aux chiffres d'il y a deux ans et les plus fortes augmentations se sont produites en Asie de l'Est, en Europe Orientale et en Asie centrale (27).

L'Afrique subsaharienne reste de loin la région la plus touchée, avec 25,8 millions de personnes vivant avec le VIH en fin 2005, par rapport aux 24,9 millions de 2003. Près de deux tiers de toutes les personnes vivant avec le VIH se trouvent en Afrique subsaharienne, ainsi que plus des trois quarts de toutes les femmes vivant avec le VIH (27)

TABLEAU II: Épidémiologie mondiale du VIH/SIDA en fin 2005 (27)

Nombre de personnes vivant avec le VIH en 2005	
Total	40,3 millions (36,7–45,3 millions)
Adultes	38,0 millions (34,5–42,6 millions)
Femmes	17,5 millions (16,2–19,3 millions)
Enfants, moins de 15 ans	2,3 millions (2,1–2,8 millions)

Nouvelles infections à VIH en 2005	
Total	4,9 millions (4,3–6,6 millions)
Adultes	4,2 millions (3,6–5,8 millions)
Enfants, moins de 15 ans	700 000 (630 000–820 000)

Décès dus au SIDA en 2005	
Total	3,1 millions (2,8–3,6 millions)
Adultes	2,6 millions (2,3–2,9 millions)
Enfants, moins de 15 ans	570 000 (510 000–670 000)

Dans ce tableau, les fourchettes autour des estimations définissent les limites dans lesquelles se situent les chiffres mêmes, sur la base des meilleures informations disponibles.

Au Mali, la dernière enquête démographique de santé [EDSM 2003] (28) a montré que le taux de prévalence pour l'ensemble du Mali était de 1,7 % en 2001 (1,3 % d'hommes et 2 % de femmes), avec des variations par régions (Tableau III). Le taux de prévalence maximum chez les femmes a été enregistré dans la région de Ségou tandis que chez les hommes il l'a été à Bamako. Le taux de prévalence maximum parmi les deux sexes a été enregistré à Bamako.

TABLEAU III : Prévalence de l'infection à VIH par sexe et par région au Mali en 2001 (28)

REGIONS	FEMMES (3864)	HOMMES (2971)	TOTAL (6846)
Bamako	2,4	2,7	2,5
Kayes	2,4	1,3	1,9
Koulikoro	2,4	1,3	1,9
Sikasso	1,4	0,4	1
Ségou	2,5	1,4	2,0
Mopti	1,7	1	1,4
Tombouctou	1,1	0,3	0,8
Gao	0	1,6	0,6
Kidal	0	0	1,5

2.2.3 Virus de l'immunodéficience humaine

2.2.3.1 Historique de la découverte du VIH

Les premiers cas de Sida ont été décrits aux Etats-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 (29). Le même phénomène fut 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 ImmuneDeficiency) (30).

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

La mise en évidence de virus éventuels demeurait 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 Cytomégalo virus et le virus d'Epstein Barr mais les isolats ne présentaient aucune spécificité par rapport aux prototypes pouvant expliquer cette nouvelle affection (31).

L'existence de 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 rétro virale.

En s'appuyant donc sur des enquêtes séro-épidémiologiques, ils montrèrent la présence d'anticorps anti-HTLV-1 chez certains malades.

Puisque 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 (32,33).

Courant 1982, les médecins français commencèrent 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, F. Barré Sinoussi et Jean Claude Cherman détecta 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 (stade préSida). Ce n'est qu'en 1983 qu'ils isolèrent un virus qu'ils nommèrent LAV (Lymphadenopathy Associated Virus) (34). Cet effet cytopathogène distinguait donc fondamentalement le LAV des HTLVs, qui eux sont plutôt transformants.

La caractérisation du LAV se poursuivie et son rôle étiologique dans le SIDA et les lymphadénopathies fut établi. L'année suivante Gallo et al. Annoncèrent l'isolement et la caractérisation du HTLV-III très proche du LAV (35). Plus tard d'autres isolats tel que l'ARV (Aids-Related-virus) furent tenus responsables de l'infection. L'analyse moléculaire des génomes clones confirma enfin l'appartenance du virus du SIDA à un groupe rétroviral bien distinct de celui des HTLVs et aussi que le LAV (équipe française) était identique au HTLV-III (équipe américaine) avec quelques variations locales ne modifiant en rien le génome et les 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 (36).

En 1986, les problèmes de nomenclature trouvèrent leur épilogue avec l'adoption de la terminologie VIH pour Virus de l'Immunodéficience humaine (37).

Pour freiner la polémique entre chercheurs français et américains, un accord concernant le partage des droits de découverte fut signé par les deux équipes en 1987.

Depuis ce jour, de nombreuses avancées furent obtenues notamment dans le développement industriel des tests de diagnostic, la mise au point des premières molécules anti-rétrovirales et la recherche vaccinale.

2.2.3.2 Les Rétrovirus

➤ Définition et historique

Au plan systématique, les VIH appartiennent à la famille des *rétroviridae* (rétrovirus) qui sont des virus enveloppés possédant un ARN de haut poids moléculaire transcrit en un ADN double brin dit «proviral» complémentaire de l'ARN viral, grâce à une ADN polymérase ARN dépendante nommée « **transcriptase inverse (TI)** » ou « **reverse transcriptase (RT)** » (38).

Pendant longtemps, les rétrovirus sont apparus comme des virus essentiellement animaux, responsables des leucémies et des sarcomes observés dans les élevages de poulets, de bovins et chez les chats domestiques ou d'infections lentement progressives comme le visna ou maedi du mouton, l'anémie infectieuse des équidés(39). Ce n'est qu'en 1980, soit 70 ans après la découverte du virus aviaire du sarcome de Rous que le premier rétrovirus humain, le HTLV1 fut décrit par l'équipe de Robert C. GALLO aux USA et celle de Y. Hinuman au Japon (39).

➤ Caractères généraux des rétrovirus

Les rétrovirus ont certaines caractéristiques communes:

- le matériel génétique est constitué d'ARN qui sous l'action d'une enzyme, la transcriptase inverse, est rétro transcrit en ADN dans la cellule infectée.

- le génome viral possède à chaque extrémité (5' et 3') une même séquence répétitive de taille variable dite LTR (Long Terminal Repeat) permettant l'intégration stable du génome viral dans l'ADN de la cellule cible (40).

➤ **Classification :**

La famille des *Retroviridae* comprend trois sous-familles : les lentivirus, les oncovirus et les spumavirus.

-*Les lentivirus* n'ont pas de pouvoir transformant ou immortalisant. Ils sont lytiques, responsables de la destruction cellulaire et de la mort de la cellule infectée (41).

-*Les oncovirus* sont des virus oncogènes induisant des leucémies, des lymphomes et des sarcomes (41).

-*Les spumavirus* sont des virus identifiés chez de nombreux mammifères. Ils ne sont associés à aucune pathologie humaine ou animale (42).

2.1.3.2 Propriétés biologiques du VIH-1

2.2.3.2.1 Morphologie (43)

L'ultrastructure du VIH mature montre une particule virale enveloppée, grossièrement sphérique de 90 à 120 nm de diamètre. Du fait de sa production par bourgeonnement de la membrane cytoplasmique de la cellule infectée, la membrane du virus est constituée d'éléments de la double couche Phospholipidique de celle-ci dans laquelle sont insérées les protéines virales en excroissance. Ces protéines, des glycoprotéines plus précisément, sont :

- **la gp 41**, hydrophobe et transmembranaire
- **La gp 120**, externe, glycosylée et hydrophobe, de haut poids moléculaire.

A l'intérieur du virion, on observe un cylindre dense allongé, plus ou moins sphérique appelé core viral et constitué d'éléments structuraux du groupe antigène, de deux molécules d'ARN de même polarité (positive), ainsi que les enzymes virales que sont la **transcriptase inverse (TI)**, l'**endonucléase / intégrase** et la **protéase**.

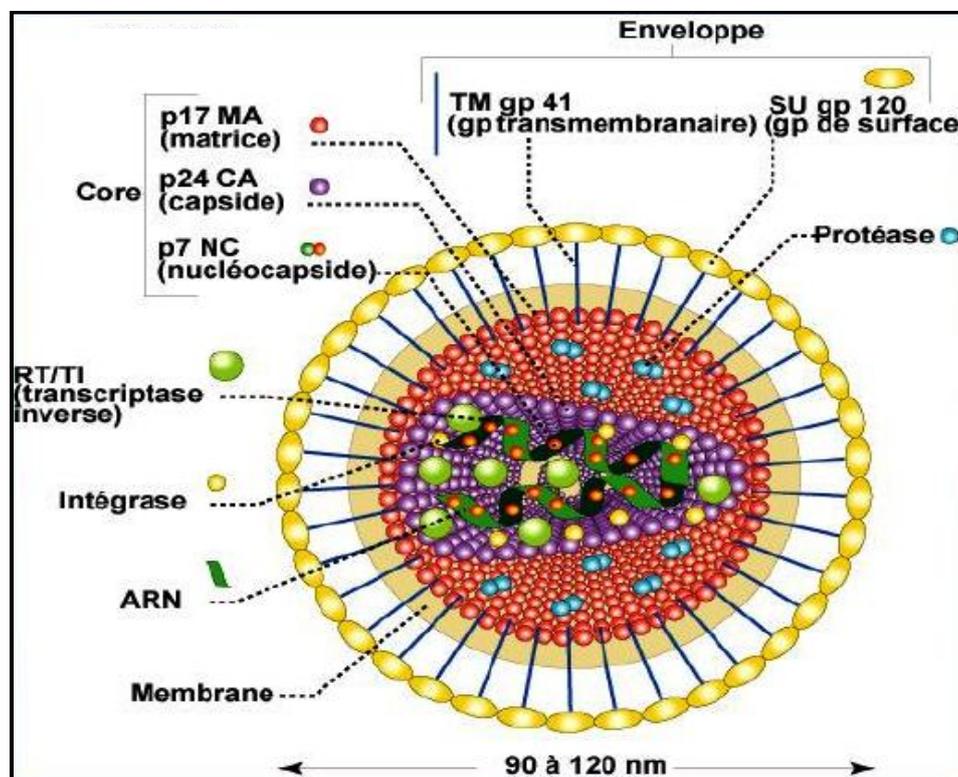


Figure 1 : Structure morphologique du VIH-1. (43)

2.2.3.2.2 Organisation génétique du VIH-1 (42)

Les VIHs sont des virus eucaryotes dont le génome est constitué de deux copies d'ARN simple brin de faible longueur (>10 kilo bases). Leur matériel génétique se présente comme suit :

Les extrémités 5' et 3' se terminent par une séquence non codante répétitive 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) parfaitement complémentaire de l'extrémité 3' de l'ARN de transfert utilisé comme amorce d'initiation de la rétro transcription.

Après la séquence PB vient la partie codante constituée des trois gènes classiques des rétrovirus (*gag, pol, env*) et des six gènes supplémentaires propres aux VIHs et ayant un rôle important dans les phénomènes de régulations (*tat, nef, rev, vif, vpr*). Le VIH-1 possède un gène dénommé *vpu* qui est inexistant chez le HIV-2; à l'inverse seul le VIH-2 possède le gène provisoirement désigné *vpx*.

➤ **Les gènes classiques**

a- le gène *gag* (group antigen)

Le gène *gag* code pour une poly protéine précurseur nommée *gag* polyprotéine de 55 kilodaltons qui est clivée par une protéase virale en trois protéines constitutives du core

- La protéine majeure de la capside **p24** (PM 2400)
- La Phosphoprotéine N-terminale, protéine de matrice **p17** (PM 1700) ;
- La Nucléoprotéine C-terminale **p15** (PM 1500) qui au cours de la maturation est clivée en deux protéines **p7, p9**.

b- Le gène *pol* (polymerase):

Il code pour trois enzymes virales qui sont :

- La Protéase p10 indispensable au clivage du précurseur gag p55
- La Transcriptase inverse (TI) sous deux formes moléculaires p64 et p53
- L'endonuclease/intégrase p34.

c- Le gène *env* (enveloppe):

Ce gène code pour un précurseur glycosylé intracellulaire de 160 Kd (gp 160) clivé dans le cytoplasme par une protéase cellulaire en deux glycoprotéines que sont la gp120 (superficielle) et la gp41 (transmembranaire).

Ces protéines d'enveloppe jouent un rôle important dans les phénomènes d'interaction virus-cellules hôtes et dans l'effet cytopathogène *in vitro* des VIH.

- **Les gènes supplémentaires :**

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* de *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 trans-activation désignée par TAR (Trans-activation Responsive) est située 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 au gène *tat*, l'exon essentiel est celui situé près de l'extrémité 3'.

Le récepteur de la protéine Rev au niveau de l'ARN viral est le RRE (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 la Nef qui serait impliquée dans la régulation négative de l'expression du virus par l'intermédiaire d'une séquence située dans le DNA proviral dite (Negative-Regulatory Element).

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

Il code pour un polypeptide à localisation cytoplasmique, le Vif intervient dans le pouvoir infectieux du virus. Son absence rend les virus libérés par la cellule pratiquement non infectieux. La transmission intercellulaire du virus est aussi 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 ce gène participerait à la maturation du virus. En son absence de nombreux virions restent soit dans la cellule, soit accrochés à la membrane plasmique.

➤ Le 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 rétro transcription suit un mécanisme très complexe qui aboutit à la création des LTR aux extrémités de l'ADN complémentaire (ADNc). Après circularisation ce dernier migre dans le noyau et intègre le génome cellulaire. Les LTR constitués des régions U3, R, U5 permettent l'insertion du virus dans l'ADN génomique de la cellule infectée. Les LTR contiennent aussi des séquences nécessaires à la transcription du provirus. Bien que ces séquences soient identiques, elles jouent différents rôles selon l'extrémité où elles se retrouvent (5' ou 3').

-Au niveau de l'extrémité 5', le LTR joue le rôle de promoteur fort de la transcription; on y retrouve, le site d'initiation de la transcription (CAAT box) et un « catalyseur » (TATA box).

-Au niveau de l'extrémité 3' le LTR est un promoteur non spécifique capable d'activer tout gène endogène ou non situé à sa proximité.

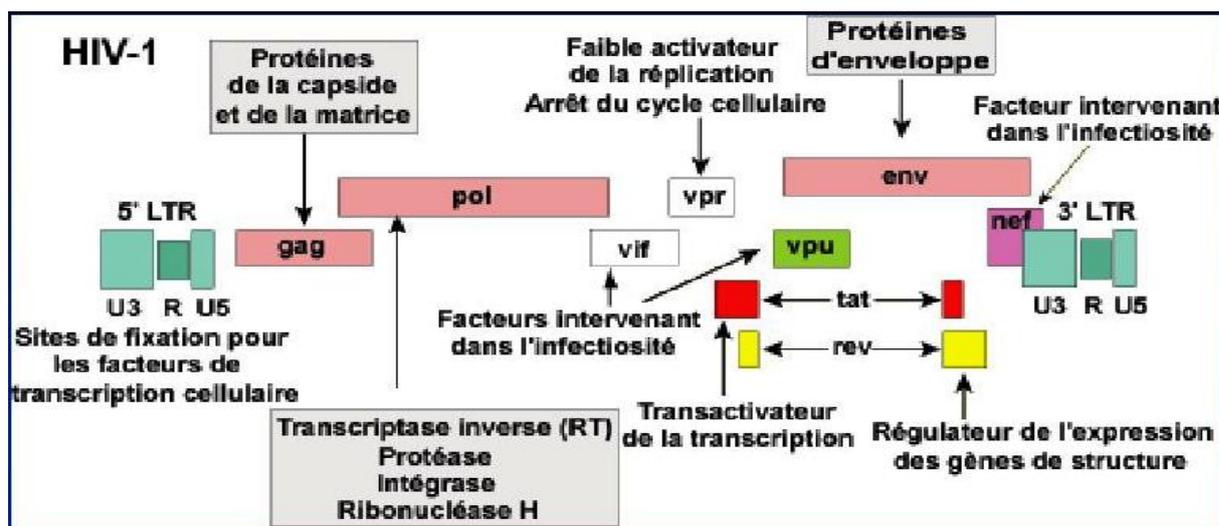


Figure 2: Représentation schématique du génome du vih-1(43)

2.2.3.2.3 Cellules cibles et réservoirs cellulaires

➤ Les cellules dendritiques

Ce sont des cellules présentatrices d'antigènes, présentes dans le thymus, la peau (cellules de Langerhans), les muqueuses ainsi que dans tous les organes lymphoïdes secondaires. Elles ont un rôle majeur dans la reconnaissance de l'antigène au cours de la réponse immune primaire (44). Ainsi, les cellules dendritiques des muqueuses génitales adsorberaient le virus à leur surface par l'intermédiaire d'une lectine appelée DC-Sign (Dendritic-Cell Specific ICAM-3-grabbing nonintegrin). Puis elles le transporteraient aux organes lymphoïdes voisins où il serait transmis aux cellules CD4 dans lesquelles il se réplique (45).

Les cellules dendritiques expriment la molécule CD4 et il a été montré qu'elles sont fréquemment infectées par le VIH *in vivo* ; et de plus il semble que la réplication du VIH dans ces cellules soit particulièrement efficace (44).

➤ **Les cellules de la lignée monocytaire**

Chez l'homme, ces cellules expriment la molécule CD4, et sont présentes dans le sang circulant sous la forme de monocytes, et dans tous les tissus sous forme de macrophages. Elles sont chargées de la capture et de la dégradation de l'antigène, puis de sa présentation aux lymphocytes T (44).

Dans le cerveau, les cellules microgliales d'origine monocytaire représentent la principale population cellulaire infectée par le VIH (44).

➤ **Les lymphocytes T**

Parmi les lymphocytes T du sang périphérique, il existe deux populations : l'une exprimant la molécule CD4 et l'autre la molécule CD8. La plupart des cellules CD8⁺ sont des lymphocytes cytotoxiques, tandis que la plupart des lymphocytes CD4⁺ sécrètent des lymphokines. La réplication virale concerne majoritairement les CD4⁺.

➤ **Les organes lymphoïdes : cibles précoces du VIH**

Dès les stades précoces de l'infection, les ganglions apparaissent contenir 5 à 10 fois plus de virus associés aux cellules ganglionnaires que les cellules mononuclées circulantes. Les ganglions ne sont pas les seuls organes lymphoïdes atteints par le VIH ; d'autres tissus tels que, la rate et le thymus sont également touchés (42).

2.2.3.2.4 Cycle de réplication (42)

Les différentes étapes de ce cycle sont essentielles pour comprendre à la fois les mécanismes de la physiopathologie, le traitement et les stratégies vaccinales éventuelles contre l'infection à VIH /SIDA.

➤ **Attachement et Pénétration :**

L'entrée du virus dans la cellule est une des étapes clés du cycle de la réplication virale. Les glycoprotéines d'enveloppe y jouent un rôle primordial.

Cette étape commence par l'interaction entre le complexe trimérique de l'enveloppe virale et le récepteur CD4. Cette première phase conduit à des modifications conformationnelles de la gp120 et de la gp41 et à une augmentation de l'affinité pour le corécepteur.

La seconde phase consistant dans la fixation du virus avec le corécepteur permet de terminer les changements de conformation de la gp41 nécessaires à la phase ultime, celle du rapprochement des deux membranes cellulaire et virale pour permettre la fusion des membranes.

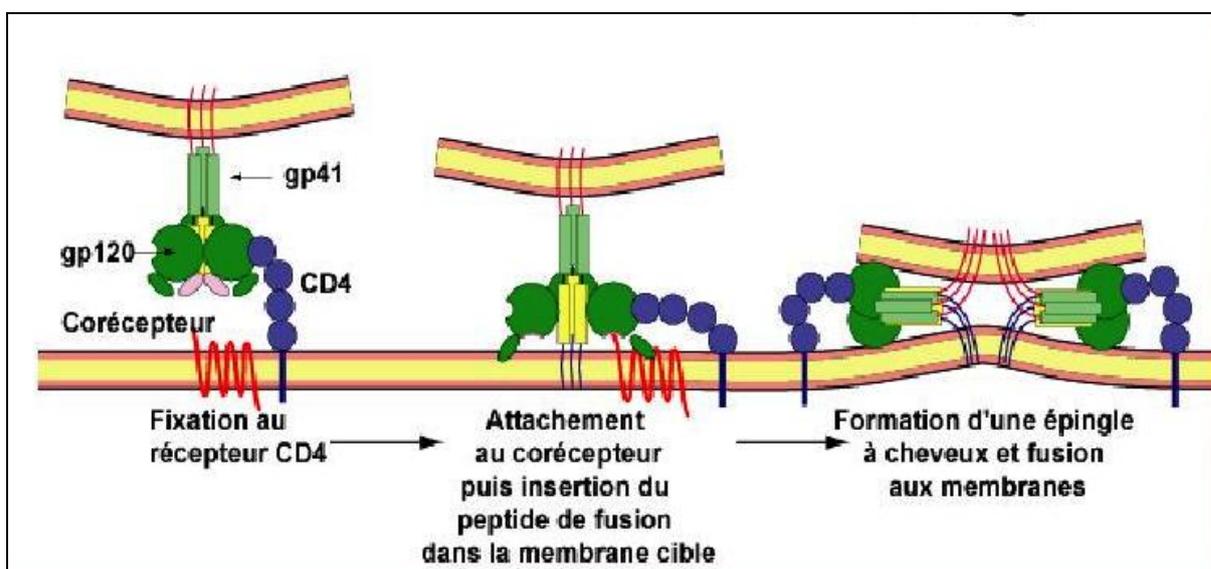


Figure 3 : Mécanisme d'entrée du VIH-1 dans la cellule cible

➤ **.Internalisation :**

Après fixation à la cellule cible, le virus y pénètre tout en se libérant de son enveloppe : c'est la décapsidation qui aboutie à la libération de l'ARN viral dans le cytoplasme.

➤ **La rétro transcription :**

Après décapsidation, l'ARN viral est transcrit en ADN intermédiaire double brin grâce à la TI. La particularité de cette enzyme réside en ses quatre différentes activités qui lui permettent à elle seule de synthétiser une copie d'ADN à partir de l'ARN viral. Ces activités sont :

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

Les étapes de la rétro transcription sont les suivantes :

- L'hybridation de la tRNA au PB (Primer binding site) pour donner 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' à la petite portion d'ADN néo-synthétisé ; C'est la circularisation.
- La rétrotranscription complète l'ARN viral donne un ADN simple brin (cDNA).
- 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 s'arrête au niveau du tARN faite 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 aux deux extrémités).

➤ **Intégration :**

L'ADN viral migre vers le noyau, et intègre le patrimoine génétique de l'hôte grâce à une enzyme virale appelée intégrase ou endonucléase.

De part la forme circulaire, l'enzyme intervient de telle sorte que l'extrémité 3' se soude à l'extrémité 5' de l'ADN chromosomique. Cet ADN intégré dans le génome cellulaire porte le nom d'ADN proviral.

➤ **Transcription du génome 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 la cellule infectée. Après un processus d'épissage, l'ARN précurseur donne des ARN messagers qui transportés dans le cytoplasme sont traduits en protéines non clivées.

➤ **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 libérées vont à leur tour infecter d'autres cellules cibles de l'organisme, accélérant ainsi la dissémination virale.

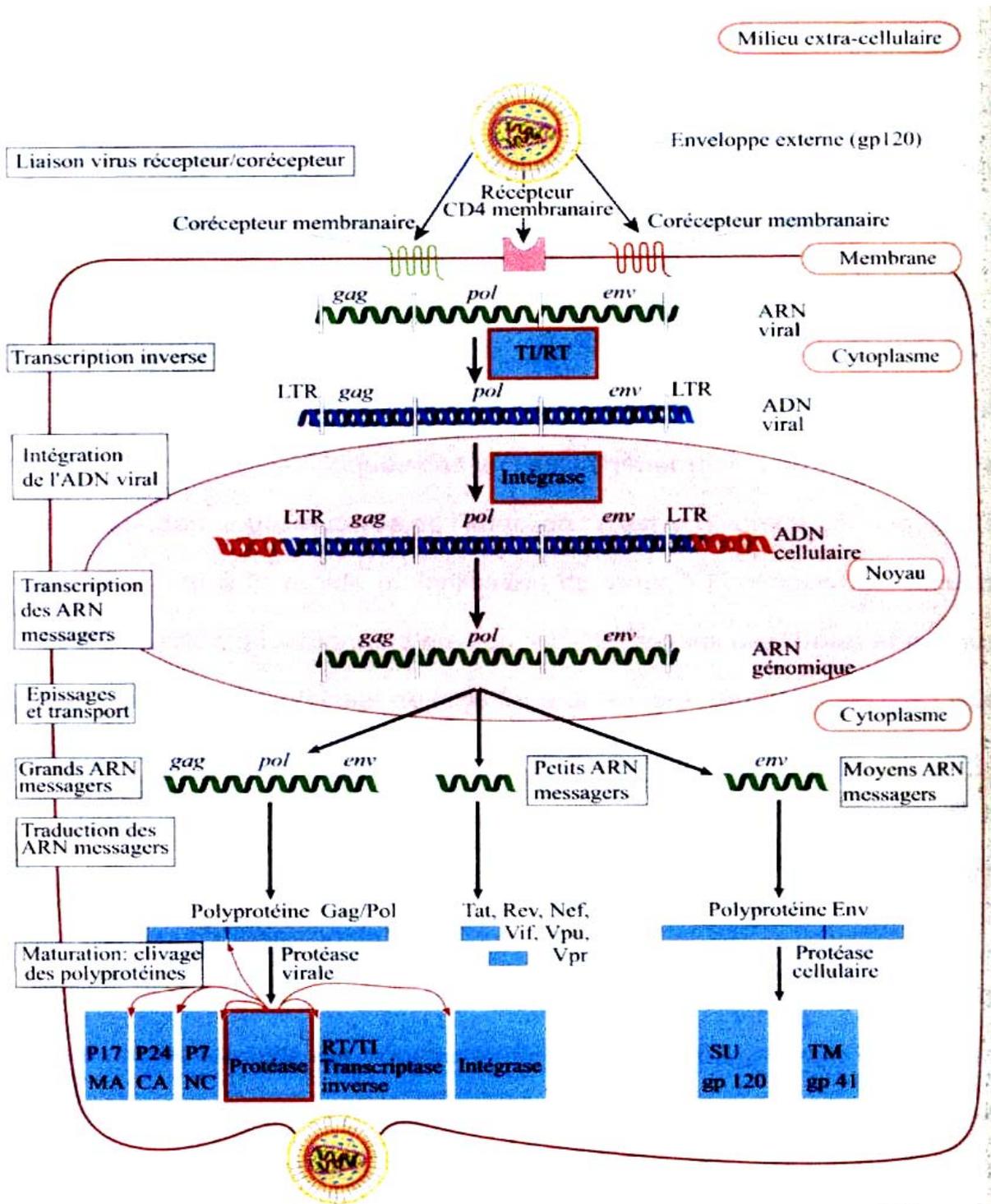


Figure 4: Cycle de réplication du VIH-1 (43)

2.2.3.2.5 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 30 mn et également par traitement pendant 5 mn à l'hypochlorite de sodium à 0,2%, l'éthanol à 70 %, le glutaraldéhyde à 0,2 % (42).

2.2.3.2.6 Variabilité génétique du 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 manque de fidélité de la TI qui commet une erreur par 10000 bases et par cycle de réplication (42).

La variabilité n'est pas uniformément répartie sur tout le génome. En effet, *gag* et *pol* sont relativement conservés alors que *env* est très variable. A l'intérieur même de la gp120, on distingue des zones hypervariables ou boucles V, séparées par des régions constantes C.

2.2.3.2.7 Classification des VIH

Il existe deux types majeurs de VIH : le VIH-1 et le VIH-2 qui résulteraient de deux transmissions zoonotiques à partir du chimpanzé *Pan troglodytes* (SIVcpz) pour le VIH-1 et du macaque *Sooty mangabey* (SIV mac) pour le VIH-2 (46).

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.

➤ Classification du VIH-1 :

-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 % (47).

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 de Thaïlande formant un sous groupe différent des souches de sous-type E rencontrées en Afrique (48).

L'analyse cladogénétique se complique d'avantage par la fréquence de virus recombinants appelés également « Forme recombinante en circulation (CRF) » (49). Ce sont des formes hybrides qui résultent de l'évolution du virus par des recombinaisons entre différents sous-types viraux lors des 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 (42). 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.

-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 isolants sont retrouvés presque exclusivement chez des patients originaires d'Afrique centrale. L'épicentre de cette forme semble être le Cameroun ou il représente 2 à 3 % des VIH-1 (49).

-Le groupe Nouveau (N) ou non-M et non-O :

Le premier isolat a été identifié en 1995 chez des patients camerounais (50). L'organisation génomique de la souche appartenant à ce groupe (YBF30) et la position des gènes de structure de YBF30 sont à peu près équidistantes de ceux du groupe M de VIH-1 et d'un virus isolé au Gabon (VIScpz-gab) ; plus éloigné du groupe O (51,52).

➤ Classification du VIH-2 :

La variabilité génétique du VIH-2 est moins importante que chez le VIH-1. Jusqu'à présent 6 sous-types ont été identifiés (A à F) (47) ; seul les deux premiers ont été convenablement caractérisés (53).

➤ Limite de la classification : (42)

Malgré l'ampleur des études menées, il est indispensable de souligner l'aspect relatif et non définitif de la classification due aux limites des techniques d'exploration (séquençage de certaines régions).

Certains génotypes définis par analyse d'un seul gène ne peuvent l'être avec un autre.

A titre d'exemple les isolats de génotype E identifiés grâce aux séquences *env* seraient rattachés au génotype A si uniquement gag était pris en compte. De plus l'insuffisance des moyens épidémiologiques limite les études dans certaines régions du monde et sur certaines populations.

2.2.3.3 Répartition géographique du VIH

L'épidémiologie moléculaire du VIH-1 montre une distribution très hétérogène.

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) (43).

En Asie, les sous-types B, C et E sont les plus retrouvés (49) avec une grande fréquence de virus recombinant dans les pays comme la Thaïlande (A/E), la Chine (B/C) (54).

En Russie, la circulation de sous-types A et B parmi les toxicomanes à Kaliningrad à entraîner l'émergence d'un hybride A/B (55).

Une grande variabilité est observée sur le continent africain, particulièrement dans le sous-type A (48).

En Afrique de l'ouest tous les sous-types sont présents avec le sous-type A prédominant. En Afrique de l'Est et dans la région des grands lacs, les sous-types A et 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 avec le sous-type A surreprésenté 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 (56). On retrouve également un CRF nommé CRF06-cpx (57) précédemment appelé 95 MI849 (58). Qui implique quatre différents sous-types A, G, et J. Bien que sa prévalence exacte ne soit pas connue, CRFO6-cpx circule aussi au Sénégal, Burkina Faso, Nigeria.

2.2.4 Pouvoir pathogène

2.2.4.1 Histoire naturelle de l'infection (59)

L'évolution de l'infection permet de distinguer trois stades :

La primo-infection

Le stade asymptomatique

Le stade SIDA.

➤ **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 la virémie, d'une diminution spontanée du nombre de lymphocytes CD4+ et d'une augmentation des CD8+. La diminution spontanée de la charge virale est due à la réponse immune T spécifique. A ce stade de l'infection, la présence du virus peut être mise en évidence par la détection de l'antigène p24 (60). La recherche d'anticorps anti-VIH est souvent négative. La primo-infection passe inaperçu dans 50 à 90 % des cas, ou se manifeste par des symptômes légers (syndrome pseudo grippal, syndrome mononucléosique, etc) qui disparaissent rapidement et spontanément.

➤ **Le stade asymptomatique**

C'est la phase chronique de durée variable dite de latence clinique, pouvant s'étendre sur plusieurs années (2-10 ans). La réplication virale montre une stabilité apparente alors quelle est particulièrement active dans les tissus lymphoïdes. Le sujet déjà contaminé ne présente aucun signe clinique visible ou palpable, mais reste néanmoins infectant. Le sujet est dit séropositif asymptomatique.

➤ **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 pathogènes opportunistes.

Cependant l'histoire naturelle de l'infection peut varier d'un individu à l'autre. Ce qui permet dans bien des cas de classer les patients selon le type de progression de l'infection.

On distingue:

- Les asymptomatiques à long terme ou “Long term non Progressors” avec une préservation relative de l’immunité adaptative à médiation cellulaire.
- Les progresseurs rapides.

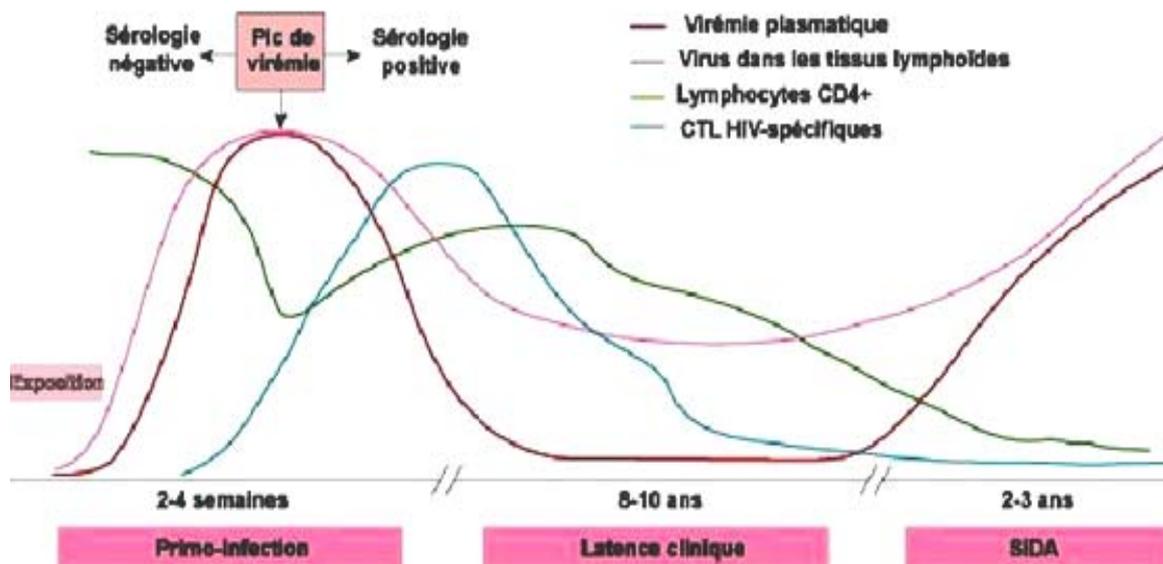


Figure 5: Histoire naturelle de l’infection à VIH/SIDA (43)

2.2.4.2 Immunologie (43)

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 complètement connu, mais on peut l'expliquer par :

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

2.2.4.3 Mode de transmission (42)

Chez le sujet infecté, le VIH est présent dans la plupart des liquides biologiques (sang, liquide céphalo-rachidien (LCR), sperme, sécrétions vaginales, lait maternel). 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.

➤ **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. 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 (43).

➤ **Transmission verticale**

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

➤ **Transmission parentérale**

Le VIH étant un agent hématogène, il peut être transmis lors des transfusions sanguines avec du sang infecté, des partages de seringues, des tatouages, des scarifications, les circoncisions ou excisions avec du matériel souillé de même que transplantations d'organes et de tissus contaminés.

Cette voie de transmission reste faible par rapport aux deux précédentes du fait de contrôles systématiques du matériel et des produits biologiques beaucoup de pays.

2.2.4.4 Facteurs de progression (26)

De nombreuses études ont tenté d'identifier les facteurs et de progression de la maladie. Il en ressort que deux types de facteurs principaux peuvent être évoqués à savoir des facteurs liés à l'hôte, ceux liés au virus.

- Les facteurs génétiques et immunologiques de l'hôte :

- Le polymorphisme génétique des co-récepteurs viraux
- Le profil des haplotypes HLA de classe I et ou II
- La qualité et la persistance de la réponse cellulaire
- Le taux de β -chémokines sécrétés,

-Les facteurs viraux :

- le tropisme
- la taille de l'inoculum
- l'ampleur de la réplication virale lors de la primo-infection
- Virulence des souches virales dues a des mutations au niveau du génome

De plus en plus l'on rajoute à ces facteurs principaux d'autres qu'on qualifie de facteurs environnementaux notamment les co-infections par plusieurs souches virales et pathogènes opportunistes

2.2.4.5 Particularité en zone tropicale

Les premières descriptions de SIDA en zone tropicale remontent à 1983, d'abord en Afrique de l'Est et Centrale, en Haïti, puis en Afrique de l'Ouest et enfin en Amérique latine et en Asie **(61)**.

Les études menées suggèrent que la durée de l'infection VIH est de 1 à 2 ans plus courte en milieu tropical, comparée à celle des pays industrialisés **(59)**.

Parmi les causes de décès observées chez des patients à Abidjan, trois infections expliquent à elles seules 53% des décès : la tuberculose, les bactériémies à bacilles Gram négatif et la toxoplasmose cérébrale **(59)**.

L'amaigrissement est présent dans plus de 80% des cas, d'où l'appellation de *slim disease* **(61)**.

La diarrhée constitue le deuxième symptôme majeur du SIDA en zone tropicale (62). Au Mali, la cryptosporidiose a été citée comme la principale cause des diarrhées dues au SIDA (63).

La tuberculose est l'infection opportuniste la plus fréquente en Afrique. Elle est devenue en Afrique sub-saharienne la première cause de mortalité chez les patients sidéens (environ 1/3 des décès). Dans les grandes villes africaines, notamment en zone de forte prévalence du VIH, 30 à 70% des tuberculoses diagnostiquées surviennent chez des patients infectés par le VIH (61).

2.2.5 Diagnostic biologique

Depuis l'identification du VIH en 1981, des efforts ne cessent d'être faits pour améliorer la qualité du diagnostic. Les méthodes utilisées sont diverses et nécessitent des adaptations aux nouveaux variants du virus. On distingue les méthodes directes et indirectes.

2.2.5.1 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 variables, mais demeurent la démarche diagnostique la plus accessible (64, 43).

➤ La technique d'agglutination (42)

Elle consiste à coupler artificiellement l'antigène viral à un support particulier (particules de latex). La présence d'anticorps dans le sérum se traduit par une agglutination des particules visibles à l'œil nu. Cette méthode moins sensible que l'ELISA est de réalisation très rapide (moins de 30 minutes) et ne nécessite aucun appareillage.

C'est l'approche utilisée dans la conception de tests rapides qui constituent un excellent recours en cas d'urgence notamment dans les PVD.

➤ **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 :

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

TABLEAU IV: Techniques utilisant un deuxième anticorps marqué (42).

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 immunossay (EIA), et repose sur des concepts différents : test sandwich, test compétition.

ELISA :

-Principe (64,42)

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.

-Avantage :

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

Inconvénient :

L'ELISA a une spécificité limitée, des réactions faussement négatives peuvent se produire pendant la fenêtre sérologique c'est-à-dire avant la séroconversion (65). Il est aussi possible que des individus séronégatifs puissent réagir positivement. Ce phénomène est observé spécialement chez les femmes multipares, car 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.

➤ **Western blot : (64,42)**

C'est une technique immuno-électrophorétique qui permet l'identification de différents anticorps dirigés contre les protéines structurales. C'est actuellement le test de confirmation de choix pour détecter la séropositivité au VIH-1.

Ces protéines sont :

- Les glycoprotéines de l'enveloppe (Env) : gp160 et gp 41. 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.

Principe :

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

Les protéines virales sont extraites, purifiées puis séparer selon leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Elles sont issues soit de virus purifiés et dissociés (lysat viral). Soit des 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 sont pris en sandwich par un conjugué marqué par une enzyme et révélé par un substrat chromogène.

Pour l'interprétation l'Organisation Mondiale de la Santé recommande pour affirmer la séropositivité :

- 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.

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.

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.

2.2.5.2 Les techniques de diagnostic direct :

Elles permettent la détection directe du virus dans les prélèvements.

➤ Test de détection de l'antigène p24 : (43)

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'immuno-capture 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 virémie est de l'ordre de 10^4 copies d'ARN viral/ml de plasma.

➤ **L'isolement du virus dans les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) : (66, 42)**

La technique consiste en l'isolement des PBMCs sur gradient de densité, suivi d'une co-culture des cellules du patient avec celles de 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 le surnageant de culture.

Avantages :

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

Inconvénients :

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

2.2.5.3 diagnostic moléculaire :

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

➤ 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 d'ADN proviral dans un prélèvement biologiques. Les régions ciblées sont localisées préférentiellement dans les gènes les plus stables 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 rétro transcription.

Application de la PCR à la recherche sur le SIDA : (66)

- 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 et 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 sous traitement anti rétroviral.
- L'évaluation de l'hétérogénéité virale.

- **Détermination de la charge virale :**

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 justifia 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.

le test se fait généralement en trois étapes : préparation des concentrés viraux, hybridation des sondes, mesure des signaux.

Cinq types de sondes sont utilisées : sondes de capture, sondes Pre-amplificatrices, sondes amplificatrices, sondes cibles, sondes de marquage.

2.2.6 Traitement

L'administration d'ARV modifie profondément l'évolution naturelle de la maladie en réduisant rapidement la réplication virale avec disparition du virus dans le plasma et suppression presque totale de la production virale dans les organes lymphoïdes (67). Les ARV commercialisés appartiennent à trois classes et ont pour cibles deux enzymes virales : la reverse transcriptase enzyme clé de la transformation de l'ARN viral en ADN et la protéase qui permet le clivage de précurseurs polypeptidiques viraux fabriqués (68). Ce sont :

- Les analogues nucléosidiques et nucléotidiques inhibiteurs de la transcriptase inverse

Zidovudine (AZT) ou Rétrovir*

Didanosine (ddI) ou Videx*

Lamivudine (3TC) ou Epivir*-

➤ Les inhibiteurs non nucléosidiques de cette même enzyme

Névirapine (NVP) ou Viramune*

Efavirenz (DMP266) ou Sustiva*

Delavirdine (DLV) ou Rescriptor*-

➤ Les inhibiteurs de la protéase

Indinavir (IDV) ou Crixivan*

Ritonavir (RTV) ou Norvir*

Saquinavir (SQV) ou Invirase*

De plus, des inhibiteurs d'attachement ou d'entrée du virus dans la cellule sont actuellement en phase d'évaluation clinique (67).

Les combinaisons de ces médicaments ont permis de transformer le pronostic d'une infection rétrovirale dont l'histoire naturelle était létale chez plus de 90% des patients en une infection chronique n'entraînant pas de déficit immunitaire cliniquement significatif (68).

Cependant il existe certains obstacles (69) :

- ✓ les difficultés d'accès aux soins
- ✓ les contraintes des traitements au long cours
- ✓ les phénomènes de résistance acquise aux ARV

Les stratégies antirétrovirales, quelles que soient leurs efficacités, ne peuvent éradiquer le virus de l'organisme et donc «guérir» totalement l'infection rétrovirale.

2.2.6.1 Choix préférentiels d'antiviraux pour le traitement initial (67)

Les trois options recommandées sont :

- ✓ deux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse et un inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse,
- ✓ deux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse et un inhibiteur de la protéase,
- ✓ un inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse associé à un inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse et à un inhibiteur de la protéase.

2.2.6.2 Mécanisme de la résistance aux ARV

La résistance aux antirétroviraux est liée à l'existence de quasi-espèces virales présentant des mutations sélectionnées quand le VIH continue sa réplication en présence de l'antirétroviral. Deux techniques permettent d'approcher la mesure de la résistance in vivo : les tests génotypiques et les tests phénotypiques.

Les tests de résistance font partie intégrante de la prise en charge thérapeutique des patients infectés par le VIH.

Tests génotypiques

Les tests génotypiques permettent l'analyse des mutations présentes dans les gènes de la transcriptase inverse (TI) ou de la protéase. La réalisation de la séquence complète des gènes de la TI et de la protéase est la technique de référence.

Tests phénotypiques

Les tests phénotypiques utilisent des virus recombinants. **(67)**

2.2 Terrain génétique de l'hôte et infection à VIH/SIDA

L'influence du terrain génétique de l'hôte sur la réponse immunitaire aux infections bactériennes, virales ou parasitaires, et par conséquent sur leur évolution clinique, voire sur la résistance à certaines d'entre elles, est indiscutablement importante dans de nombreux modèles animaux et chez l'homme. Dans cette optique, le cas de l'infection par le VIH est particulièrement complexe et riche de possibilités d'investigation. (70) La susceptibilité individuelle au VIH et la résistance à l'infection font l'objet, depuis 1995, de nombreuses recherches. L'hypothèse d'une base génétique de la sensibilité à l'infection de l'homme par le VIH a été confirmée par des études de génétique des populations. (71)

2.3.1 Facteurs de l'évolution de l'infection par le VIH

Trois types de facteurs peuvent influencer l'évolution de l'infection par le VIH-1 : Des facteurs d'origine virale avec des souches plus ou moins pathogènes que d'autres. Par exemple une souche présentant une délétion au niveau du gène *Tat* du virus a été décrite pour laquelle les sujets infectés sont non progressifs.

Des facteurs environnementaux comme les co-infections par d'autres agents microbiens qui favorisent l'hyperactivation immunitaire et la réplication virale. Enfin des facteurs génétiques de l'hôte.

Parmi ces facteurs prédictifs d'évolution de l'infection, deux semblent indissociables. A savoir les critères virologiques et les facteurs relatifs à l'arrière plan génétique de chaque individu. (71)

2.3.1.1 Facteurs d'origine virale (72)

Les facteurs virologiques d'évolution du VIH/SIDA concernent essentiellement les spécificités de la souche infectante il s'agit notamment du tropisme (R5 ou X4),

de la taille de l'inoculum, de l'ampleur de la réplication virale lors de la primo-infection et des mutations au niveau du génome.

Par exemple une souche virale présentant une délétion au niveau du gène *Tat* a été décrite pour laquelle les sujets infectés sont non progresseurs.

2.2.1.2 Facteurs génétiques de l'hôte

Au niveau de l'hôte, les facteurs relatifs à l'arrière plan génétique de chaque individu permettent d'expliquer, du moins en partie, la non évolution de la maladie chez les sujets infectés asymptomatiques ou non progresseurs à long terme. Les éléments significatifs les plus évoqués sont le polymorphisme génétique des co-récepteurs viraux, le profil des haplotypes HLA de classe I et II, la qualité et la persistance de la réponse cellulaire, le taux de β -chémokines sécrétés.

2.2.1.3 Gènes impliqués dans la réponse immunitaire (70)

L'efficacité de la réponse immune est un facteur important de la résistance aux effets délétères du VIH. De ce fait l'influence des gènes du système majeur d'histocompatibilité (HLA chez l'homme) devrait être déterminante. En effet, le rôle de présentation antigénique des molécules HLA en fait un élément clé du déclenchement de la réponse immune humorale et cellulaire et leur extrême polymorphisme est à l'origine des variations qualitatives et quantitatives interindividuelles de la réponse à un même antigène. En pathologie infectieuse, un bon exemple en est l'association entre certains allèles HLA de classe I et II et la protection contre les formes graves de paludisme, un polymorphisme du gène du $\text{TNF}\alpha$ jouant aussi un rôle. Il est d'ailleurs tout à fait probable que sous la pression sélective de différents pathogènes, les populations humaines aient ainsi subi une évolution responsable des différences immunogénétiques aujourd'hui observées entre les cinq continents. Ce dernier point n'est pas indifférent si on considère que

le VIH est un virus récemment introduit dans l'espèce humaine à l'échelle de toute la planète. Quoiqu'il en soit, de nombreuses études ont testé l'idée que l'évolution de l'infection à VIH pourrait être influencée par les gènes du système HLA, avec des résultats jamais très spectaculaires mais construisant peu à peu un puzzle où des allèles HLA de classe I et II sont associés à des phénotypes d'évolution plutôt défavorable (**HLA-B35, DR1, DR3, DQ1**) ou moins rapide (**HLA-A1, A2, B14, B17, B27**).

2.2.2 Gènes impliqués dans l'interaction virus-cellules cibles

Il s'agit pour l'essentiel des gènes codant pour les chimiokines et leurs récepteurs. En effet, plusieurs récepteurs de chimiokines jouent le rôle de corécepteurs pour le VIH. Leurs gènes sont caractérisés et des mutations de ces gènes ne sont pas rares. Ainsi, l'absence d'expression, due à une délétion génique homozygote, d'un récepteur cellulaire du virus (le récepteur de chimiokines CCR5) confère une résistance presque absolue à l'infection. Et que la délétion à l'état hétérozygote protégeait contre une évolution rapide du déficit immunitaire. **(71)**

Une mutation dans le gène d'un autre récepteur de chimiokines, CCR2, a aussi été associée à une évolution moins rapide, mais la délétion de CCR5 et la mutation de CCR2 semblent être fréquemment associées par déséquilibre de liaison. Enfin, une mutation dans le gène de la chimiokine SDF1, ligand physiologique du récepteur CXCR4 utilisé par les souches lymphotropes de VIH, aurait le même effet. **(71)**

2.2.3 Les chimiokines et leurs récepteurs dans l'infection à VIH /SIDA

2.2.3.1 Engagement du co-récepteur dans l'interaction virus-cellules cibles.

La liaison de la gp120 à son récepteur primaire CD4 ne permet pas à elle seule d'aboutir à la fusion des membranes. La liaison au CD4 induit des changements conformationnels de la gp120 qui démasquent des sites d'interaction avec un second récepteur appelé alors co-récepteur. Tous les isolats primaires étudiés jusqu'alors utilisent comme co-récepteur des récepteurs de chimiokines, principalement CCR5 et CXCR4. CCR5 a été mis en évidence comme co-récepteur du VIH peu de temps après son clonage en 1996 (73-77), alors que dans le cas de CXCR4, c'est son rôle comme co-récepteur du VIH qui a permis d'identifier son ligand endogène et de le reclasser dans la famille des récepteurs de chimiokines (78).

Néanmoins, plusieurs études *in vitro* montrent que le virus a la capacité d'utiliser d'autres récepteurs de chimiokines, CCR2b, CCR3, CCR8, D6 et CX3CR1 ainsi que le récepteur du cytomégalo virus US28 ou encore des récepteurs orphelins tels *apj*, *gpr1*, *gpr15/BOB*, *dez/ChemR23* et *strl33/BONZO* avec des efficacités différentes (73,79-81). De très faibles taux d'expression du récepteur peuvent suffire à l'entrée du virus (82).

2.2.3.2 Phénotype du virus lié à l'utilisation du co-récepteur (83)

L'hétérogénéité de l'enveloppe définit des phénotypes biologiques et un tropisme cellulaire. Les souches dites M-tropiques (Macrophages), ou R5, utilisent CCR5 comme co-récepteur et n'induisent en général pas la formation de syncytium (masse cytoplasmique étendue contenant de nombreux noyaux et résultant de la fusion d'une cellule infectée avec plusieurs cellules saines de son entourage), et grandissent dans les macrophages. Les souches dites T-tropiques (lymphocytes T),

ou X4, utilisent CXCR4 comme corécepteur, induisent la formation de syncytium et se développent dans les cellules T. Les souches présentant les deux tropismes (R5X4) ont la faculté de se développer dans les deux types cellulaires.

Le récepteur CCR5 est souvent associé au processus de transmission d'homme à homme et à la primo-infection. L'émergence des souches X4 et des souches R5X4 dans les stades plus tardifs de l'infection est associée à une progression de la maladie vers le stade SIDA due notamment à une déplétion des lymphocytes T CD4+ et à une forte augmentation de la charge virale chez les individus infectés.

Néanmoins, un gain de l'utilisation de CXCR4 n'est pas observé chez tous les patients atteints. L'existence de souches R5 est maintenue après l'émergence de souches X4 indiquant que différents types de virus coexistent in vivo, et avec une utilisation différente des co-récepteurs **(84)**.

Le choix de l'utilisation du co-récepteur est gouverné par des régions variables de la sous-unité gp120, en particulier la boucle V3, et dans une moindre mesure la région V1/2 **(73)**. Le mécanisme moléculaire par lequel les souches virales utilisent CXCR4 plus tardivement dans l'infection n'est pas connu. Néanmoins, une étude visant à étudier le rôle des glycosylations de la gp120 a permis de montrer que la perte d'une N-glycosylation dans la région V3 de la gp120 était déterminante dans le choix d'utilisation du co-récepteur et que cette modification était à l'origine d'un changement de phénotype de R5 vers X4 **(85)**.

2.2.3.3 Structure des récepteurs de chémokines

Les récepteurs de chimiokines sont des glycoprotéines de la surface cellulaire à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G**(5,6)** leurs liaisons aux chimiokines assure la médiation du chimiotactisme des cellules lymphocytaires et des macrophages vers les lieux de l'inflammation. Ils joueraient aussi un rôle de control dans la prolifération et la différenciation de la lignée granulocytaire. **(7)**

Comme les chimiokines elles-mêmes, les récepteurs peuvent être divisés en au moins trois branches structurales : CR, CCR, et CXCR, suivant les variations au sein d'un motif partagé de cystéines dans la structure protéique.

Certaines chimiokines ont la capacité de se lier à plusieurs récepteurs et un même récepteur peut lier plusieurs chimiokines. On note tout de même quelques couples uniques, notamment CXCR4 et CXCL12; CXCR5 et CXCL13; CXCR6 et CXCL16; CX3CR1 et CX3CL1; CCR8 et CCL1; CCR9 et CCL25 (83)

TABLEAU V: Les récepteurs de chimiokines et leurs ligands chez l'homme (86)

Récepteur	Ligand correspondant
CXCR1	CXCL6, 8
CXCR2	CXCL1, 2, 3, 5, 6, 7, 8
CXCR3	CXCL9, 10, 11
CXCR4	CXCL12
CXCR5	CXCL13
CXCR6	CXCL16
XCR1	XCL1, 2
CX3CR1	CX3CL1
CCR1	CCL3, 5, 7, 13, 14, 15, 16, 23
CCR2	CCL2, 7, 13
CCR3	CCL5, 7, 8, 11, 13, 15, 24, 26
CCR4	CCL17, 22
CCR5	CCL3, 4, 5
CCR6	CCL20
CCR7	CCL19, 21
CCR8	CCL1
CCR9	CCL25
CCR10	CCL27, 28

TABLEAU VI: Récepteurs de chimiokines et maladies humaines associées (87)

Récepteur	Expression	Fonction présumée	Indication thérapeutique
CCR1	N, M, MΦ, T, B, Eo, Ba, P, IDC, MeC	Réponse Th1	Sclérose en plaques, polyarthrite rhumatoïde, rejet de greffe, myocardite virale
CCR2	M, MΦ, T, Ba, NK, IDC, End, F	Inflammation	Sclérose en plaques, arthrite, asthme, glomérulonéphrite, athérosclérose
CCR3	Th2, Eo, Ba, MC, P, DC	Réponse Th2	Asthme, dermatite de contact
CCR4	Th2, Ba, P, IDC	Réponse Th2	Septicité, asthme, dermatite de contact
CCR5	M, MΦ, Th1, NK, Thy, DC, ASMC	Réponse Th1	Sclérose en plaques, polyarthrite rhumatoïde, inflammation intestinale, rejet de greffe, infection à VIH
CCR6	M, MΦ, T, B, IDC	Fonction des DC	Psoriasis
CCR7	T, B, DC	Migration des L et des DC vers les noeuds lymphoïdes	Cancer
CCR8	N, M, T, B, Thy	Réponse Th2	Dermatite atopique, asthme,
CCR9	T, Thy	Trafic des L (thymus et intestin)	Inflammation intestinale, Maladie de Crohn
CCR10	T, Mel, DerEnd, DerFib, Lang	Trafic des L (peau et colon)	Inflammation de la peau, colites ulcéreuses
CXCR1	N, MΦ, T, M, DC, Ast, End	Recrutement des N	Lésion dans la reperfusion des poumons, goutte, psoriasis, cancer
CXCR2	N, MΦ, T, M, DC, Eo, End	Recrutement des N et angiogenèse	Lésion dans la reperfusion des poumons, goutte, psoriasis, cancer, athérosclérose
CXCR3	N, Th1, B, DC, Eo, P, MeC, SMC	Réponse Th1	Sclérose en plaques, polyarthrite rhumatoïde, sarcoïdose, rejet de greffe, cancer
CXCR4	N, M, MΦ, T, B, DC, P, Ast	Organogenèse	Infection à VIH, cancer
CXCR5	M, MΦ, T, B, Ast, Neuron	Migration des cellules B	ND
CXCR6	T, DC	inconnue	ND
CX3CR1	N, M, MΦ, Neuron	Adhésion cellulaire	Rejet de greffe, glomérulonéphrite, inflammation du SNC
XCR1	T	inconnue	ND

Abréviations : **B** : cellules B ; **Ba** : basophiles ; **(I)DC** : (immatures) cellules dendritiques ; **Eo** : éosinophiles ; **M** : monocytes ; **MC** : mastocytes ; **MΦ** : macrophages ; **N** : neutrophiles ; **NK** : cellules natural killer ; **P** : plaquettes ; **T** : lymphocytes ; **Th** : lymphocyte T helper ; **MeC** : cellules mésangiales ; **End** : endothélium ; **F** : fibroblastes ; **ASMC** : Aortic Smooth Muscle Cell ; **Thy** : thymocytes ; **Ast** : astrocytes ; **Mel** : mélanocytes ; **DerEnd** : dermal endothelium ; **DerFib** : dermal fibroblast ; **Lang** ; cellules de Langerhans ; **SMC** : Smooth Muscle Cell **VIH** : Virus de l'Immunodéficience Humaine ; **SNC** : système nerveux central **ND** : non déterminé

2.2.3.4 CCR5 et susceptibilité à l'infection à VIH/SIDA

➤ Génétique et clonage

Le récepteur CCR5 est une protéine de 40 600 dalton contenant 352 acides aminés (7). Le gène codant pour CCR5 est localisé sur le chromosome 3 au niveau du locus 3p21 (12). Le gène comporte quatre exons et deux introns. Il n'y pas d'intron entre les exons 2 et 3. L'exon 4 contient la phase ouverte de lecture (ORF=open reading frame), la totalité de la région 3'UTR et 11 nucléotides de la région 5'UTR. Les transcrits sont initiés par deux promoteurs distincts riches en A et T et en motif TATA ou CAAT. Les séquences de régulation et les exons non codant sont polymorphiques alors que la séquence protéique ne l'est pas. (88)

Le chromosome 3 porte aussi le gène de CCR2, corécepteur mineur du VIH-1. En effet CCR5 et CCR2 sont généralement associés dans l'expression et la signalisation par déséquilibre de liaison chromosomique.

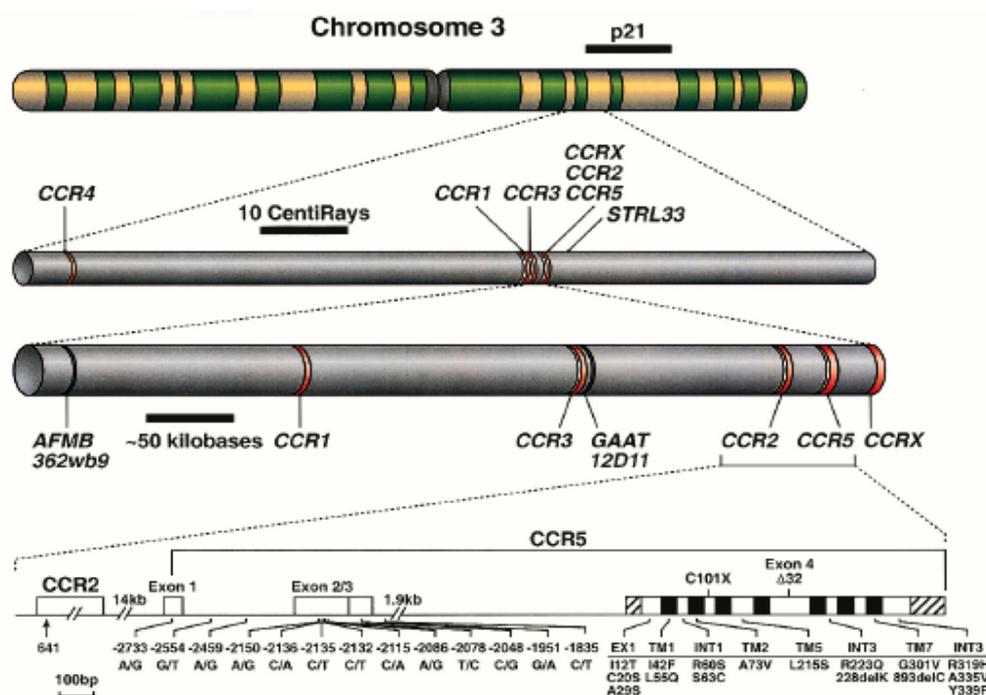


Figure 6 : Carte génétique du gène des récepteurs de chémokines sur le chromosome humain 3p21 (92)

➤ **Fonction et expression**

CCR5 est exprimé par de nombreux types cellulaires, tels les cellules dendritiques immatures, les monocytes et macrophages, les lymphocytes T mémoire (Th1) ou encore les cellules de Langerhans, mais aussi les fibroblastes ou les cellules épithéliales (89). On retrouve également ce récepteur au niveau des organes lymphoïdes primaires et secondaires. Dans le système nerveux central, CCR5 est exprimé sur les neurones, les astrocytes et par les cellules de la microglie. Dans d'autres tissus, CCR5 est exprimé au niveau de l'épithélium, de l'endothélium, du muscle lisse ou des fibroblastes.

➤ **Structure tridimensionnelle et site de fixation du ligand**

A l'heure actuelle, aucune structure tridimensionnelle de récepteurs de chimiokines n'est disponible. Comme c'est le cas pour tous les récepteurs couplés aux protéines G, la difficulté principale résulte dans l'obtention de cristaux.

On recense cependant quelques protocoles de purification de CCR5 qui préservent la liaison du ligand. La structure est généralement déduite par analogie à celle des récepteurs couplés aux protéines G disponibles telle la rhodopsine (90,91). (Fig. 8).

➤ **Mutation delta 32 de CCR5**

Une des conséquences majeures du rôle crucial des co-récepteurs dans l'infection à VIH fut la découverte d'un mutant de CCR5, consistant en une délétion de 32 paires de bases dans l'exon 4 du gène entre les positions 794 et 825 de la séquence du cDNA. Il se produit donc un changement de la phase ouverte de lecture après l'acide aminé 174; ce qui entraîne l'inclusion de 7 nouveaux acides aminés et une troncation au niveau du codon 182. (11, 93, 12, 7,15). La délétion de 32 paires de bases aboutit ainsi à la formation d'une protéine tronquée au niveau du troisième domaine extracellulaire qui s'exprime moins bien à la surface cellulaire car ayant

perdu trois de ses sept domaines transmembranaires **(94)**. Les individus portant cette mutation sont résistants à l'infection par VIH-1. In vitro, les lymphocytes T CD4+ et les macrophages isolés de patients portant cette mutation sont réfractaires à l'infection par les souches R5 du VIH-1. Par contre ils sont facilement infectés par les souches X4 qui utilise le récepteur CXCR4.

Les individus homozygotes pour cette mutation qui représentent environ 1% de la population caucasienne, montrent une forte résistance à l'infection par VIH-1 et sont par ailleurs en parfaite santé **(7,11)**. Ceci suggère que la fonction de CCR5 est redondante ou bien compensée. Les individus hétérozygotes ont une expression réduite de CCR5 à la surface cellulaire en raison d'un effet dominant négatif de la protéine CCR5 Δ 32 **(95)**.

La prévalence de cette mutation dans les pays du nord de l'Europe a permis d'émettre l'hypothèse que cette mutation aurait été véhiculée par les Vikings **(96)**.

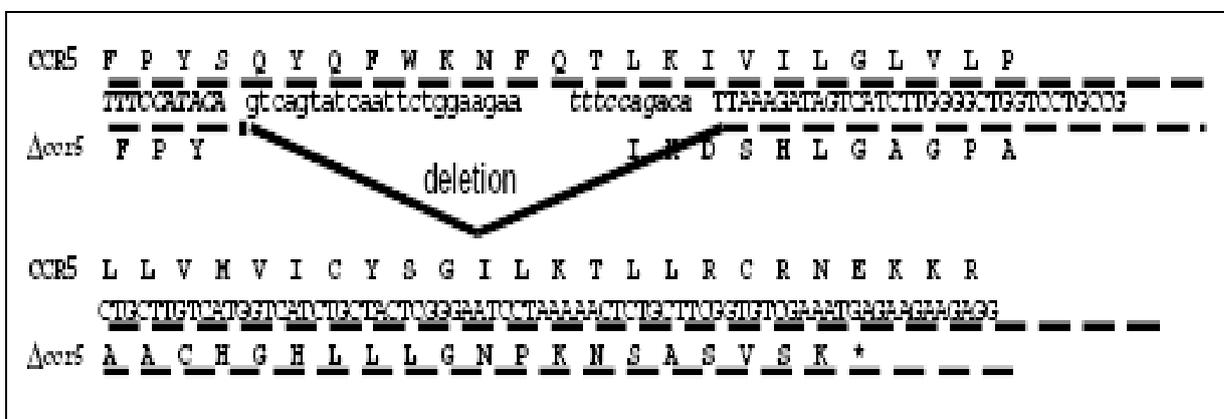
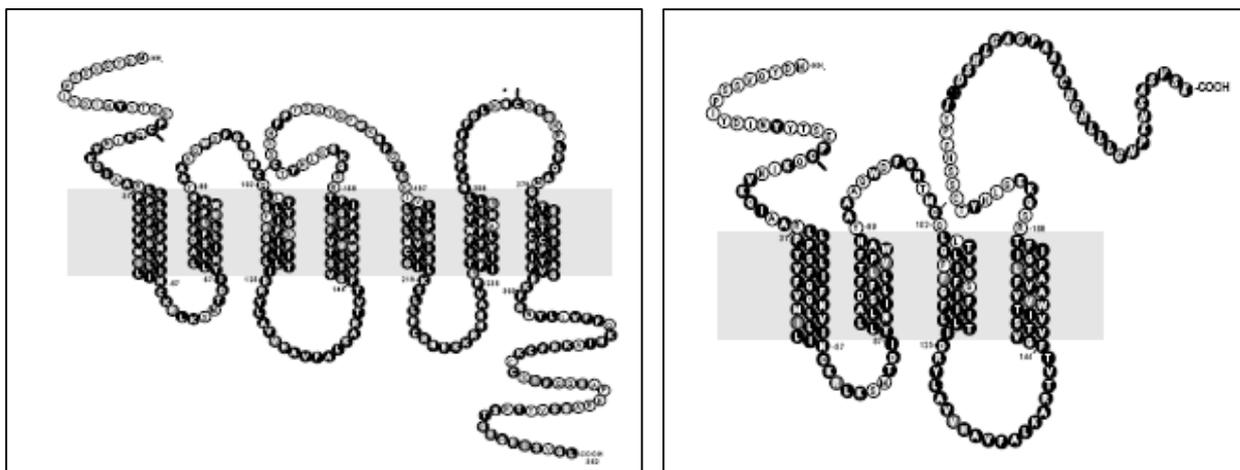


Figure 7 : Portion de gène *CCR5* et séquence aminoacide avec la délétion $\Delta 32$ (97).

Cette figure montre une portion du gène *CCR5* environnante du site de la délétion $\Delta 32$ avec la traduction en séquence aminoacide pour le récepteur *CCR5* normal (en haut) et le mutant (en bas). La séquence répétitive caractéristique de 10 paires de bases est représentée en italique. La séquence de la délétion est en petits caractères.



A. CCR5 normal (98)
(97)

B. CCR5 avec mutation Δ 32

Figure 8 : STRUCTURES PREVISIONNELLES DE CCR5 (98)

A. Structure prévisionnelle avec séquence en aminoacides de la forme normale du récepteur CCR5 : cette forme typique comporte trois domaines extracellulaire, trois domaines intracellulaire et sept domaines transmembranaires. La bande grise représente la membrane cellulaire.

B. Structure prévisionnelle avec séquence en aminoacides de la forme tronquée du récepteur CCR5 (mutation Δ 32). La protéine tronquée se présente sans les trois derniers domaines transmembranaires. Cette structure est établie par analogie avec celle de la forme normale. La maturation correcte de cette protéine mutante sur la membrane plasmique n'a pas été démontrée.

➤ **Epidémiologie moléculaire de la mutation Delta 32 de CCR5**

L'estimation de la fréquence de l'allèle muté dans diverses populations montre de grandes disparités ethnico raciales. Ainsi chez les populations caucasiennes, on aurait environ 15% d'hétérozygotes pour 1% d'homozygotes alors que l'allèle muté serait virtuellement rare chez les personnes d'origines africaine et asiatique (16).

TABLEAU VII ; Epidémiologie moléculaire de la mutation delta 32(99)

2. Population studies of CCR5 genotypes								
Author	Population	Ethnicity	HIV Status	No.	*CCR5 Genotypes % (No.)			Δ32 allele freq. (%)
					W/W	W/ Δ32	Δ32/Δ 32	
Liu et al. (9)	High-risk, USA	Caucasian	Neg	15	80.0 (12)	0 (0)	20.0 (3)	0.200
	General, USA	Caucasian	Neg	122	80.3 (98)	19.7 (24)	0 (0)	0.098
	General, S. Amer.	Venezuelan	Neg	46	100 (46)	0 (0)	0 (0)	0
Samson et al. (16)	General, Europe	Caucasian	Neg	704	82.7 (582)	16.2 (114)	1.1 (8)	0.092
	General, Asia	Japanese	Neg	248	100 (248)	0 (0)	0 (0)	0
	General, Africa	Ctrl/W. African	Neg	124	100 (124)	0 (0)	0 (0)	0
	AIDS clinics, Paris	Caucasian	Pos	723	89.2 (645)	10.8 (78)	0 (0)	0.054
Dean et al. (17)	High-risk, USA	Mixed	Neg	883	81.9 (724)	15.6 (138)	2.4 (21)	0.10
	High-risk, USA	Mixed	Pos	1883	85.9 (1618)	14.0 (264)	0.0005 (1)	0.071
	High-risk, USA	African-Amer.	Mixed	620	96.6 (599)	3.4 (21)	0 (0)	.017
	High-risk, USA	Mixed	Mixed	1250				0.115
	Low-risk, USA	Caucasian	Mixed	143				0.080
Huang et al. (12)	High-risk, USA	Caucasian	Pos	461	79.8 (368)	20.2 (93)	0 (0)	0.101
	High-risk, USA	Caucasian	Neg	446	78.0 (348)	16.7 (82)	3.6	0.128
	Blood donors, USA	Caucasian, 95%	Neg	637	85.2	13.3	1.4	0.08
	General, Africa/Haiti	Black	Mixed	137	100	0 (0)	0 (0)	0
	General, Asia	China/Thai/ other	Mixed	191	100	0 (0)	0 (0)	0
Michael et al. (18)	High-risk, USA	Mixed	Pos	406	87.5 (348)	14.3 (58)	0 (0)	0.071
	High-risk, USA	Mixed	Neg	21	71.4 (15)	9.5 (2)	19.1 (4)	0.238
	Intermed.-risk, USA	Mixed	Neg	240	78.3 (188)	20.4 (49)	1.3 (3)	0.115
Biti et al. (20)	High-risk, Australia	Caucasian	Pos	265	N/A ^c	N/A	0.004 (1)	N/A
Theodoru et al. (22)	High-risk, Europe		Pos	412	N/A	N/A	0.002 (1)	N/A
Eugenolsen et al. (23)	High-risk, Denmark	Caucasian	Neg	35	74 (26)	20 (7)	6 (2)	0.157
	High-risk, Denmark	Caucasian	Pos	99	78 (77)	22 (22)	0	0.111
	Blood donors, Denmark	Caucasian	Neg	37	73 (27)	24 (9)	3 (1)	0.149
Zimmerman et al. (19)	Blood donors, N. America	Caucasian	Neg	387	77.5 (300)	21.7 (84)	0.8 (3)	0.116
		African-Am.	Neg	294	94.2 (277)	5.8 (17)	0 (0)	0.29
		Hispanic	Neg	290	92.8 (269)	6.9 (20)	0.3 (1)	0.38
		Asian	Neg	164	99.4 (163)	0.6 (1)	0 (0)	0.003
		Native Amer.	Neg	87	83.9 (73)	12.6 (11)	3.4 (3)	0.098
	Blood donors, India	Tamil	Neg	46	100 (46)	0 (0)	0 (0)	0
	Blood donors, W. Africa	Black	Neg	40	100 (40)	0 (0)	0 (0)	0
	High risk, USA	Caucasian	Pos	614	77.4 (475)	22.6 (139)	0 (0)	0.113
	High risk, USA	African-Amer.	Pos	86	97.7 (84)	2.3 (2)	0 (0)	0.012
	High risk, USA	Hispanic	Pos	45	93.3 (42)	6.7 (3)	0 (0)	0.033
High risk, USA	Caucasian	Neg	111	73.9 (82)	21.6 (24)	4.5 (5)	0.153	
High risk, USA	African-Amer.	Neg	2	50.0 (1)	0 (0)	0.250		
High risk, USA	Hispanic	Neg	12	91.7 (11)	8.3 (1)	0 (0)	0.042	

^a CCR5 genotypes: W/W, homozygous wild type; W/ Δ32, heterozygous wild type/32bp deletion; Δ32/Δ 32, homozygous for the 32 bp deletion.

^b Numbers updated to include additional Multicenter Hemophilia Cohort Study patients studied by O'Brien et al. (21) and Dean et al. (pers. comm.).

^cNot available.

➤ **Autres polymorphisme de CCR5 :**

L'importance de CCR5 pour la transmission du virus a été confirmée par Une autre étude visant à étudier l'importance des mutations de CCR5 porte sur l'analyse de 16 autres mutants naturels de CCR5 décrits dans diverses populations. Parmi ces 16 mutants, 10 lient les ligands naturels avec une affinité comparable au récepteur sauvage, répondent fonctionnellement aux chimiokines et agissent normalement en tant que co-récepteur. Par contre 6 mutants présentent une altération de leur capacité de réponse aux chimiokines :

- soit par séquestration intracellulaire ou faible taux d'expression à la membrane,
- soit par leur incapacité à activer le récepteur
- soit par une perte d'affinité pour les ligands **(83)**

Parmi ces mutants, 5 ont la capacité de jouer le rôle de co-récepteur. Seul le mutant C101X, tout comme CCR5 Δ 32 ne permet pas l'entrée du virus **(100)**. Ce mutant constitue un argument supplémentaire allant dans le sens de la recherche d'inhibiteurs de CCR5 en matière de traitement de l'infection à VIH. **(38)**

➤ **Application thérapeutique : Antagonistes de CCR5**

CCR5 constitue une cible de choix pour la recherche de nouveaux médicaments dans la mesure où ce récepteur est utilisé par les isolats primaires et joue un rôle critique dans l'établissement et le maintien de l'infection.

Par ailleurs, la mutation CCR5 Δ 32 montre que ce récepteur n'est pas indispensable à une bonne santé du patient. Le TAK-779 (Société Takeda) fut la première molécule antagoniste de CCR5 découverte. Le TAK-779 est un composé non peptidique, de faible poids moléculaire qui antagonise la liaison de RANTES sur CCR5 et bloque la réponse calcique à des concentrations nanomolaires (1.6 à 3.7 nM). Il est actif à la fois sur les souches de laboratoire et sur des souches issues de patients infectés. Il est sans effet sur les souches X4 **(101)**. Cette molécule se lie à CCR5 au niveau d'une cavité formée par les hélices transmembranaires I, II, III

et VII **(102,103)**. Cette drogue est administrée par injection et des complications au niveau du site d'injection, visiblement liées à la structure ammonium quaternaire de la molécule ont mis fin à l'étude. D'autres composés dépourvus de ces charges positives sont actuellement en développement. Une nouvelle molécule, le TAK-220, qui inhibe sélectivement la liaison de RANTES et MIP-1 α (mais pas MIP-1 β) sur CCR5 est en phase pré-clinique **(104)**. Les molécules SCH-C et SCH-D (Société Schering-Plough) sont des oximes pipéridines inhibiteurs spécifiques des souches R5 pour un large spectre de souches testées. SCH-C bloque également la réplication des souches R5 sur un modèle de souris SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency). Le site de fixation semble se situer au niveau d'une cavité formée par les hélices transmembranaires I, II, III et VII. Il semblerait que cette molécule agisse non seulement en bloquant la liaison de la gp120 par gêne stérique, mais également en modifiant la conformation des domaines extracellulaires de CCR5. Ce composé présente un profil pharmacologique favorable, une bonne biodisponibilité orale et une demi-vie dans le sérum de 5 à 6 heures. Les premiers essais cliniques (25 mg par jour, voie orale pendant 10 jours, 12 patients) ont permis de mettre en évidence une réduction de la charge virale d'un demi-logarithme pour 10 patients **(105)**. Néanmoins, une administration prolongée à forte dose de la molécule engendre des problèmes cardiaques **(106)**. La compagnie s'est tournée vers le SCH-D qui a une meilleure activité antivirale que le SCH-C (0.1 à 0.3 nM). Cette molécule est en essai clinique.

La molécule UK-427,857 (Société Pfizer) est un antagoniste de CCR5 inhibiteur non compétitif des chimiokines, qui agit sur un large spectre de souches de laboratoires à des concentrations nanomolaires **(108)**. Le composé est administré par voie orale et bien toléré par les individus sains. L'activité antivirale chez les patients infectés n'a pas encore été rapportée. Le E913 (Sociétés Ono

Pharmaceuticals et GlaxoSmithKline) bloque la liaison de MIP-1 α sur CCR5 et la mobilisation de calcium et inhibe la réplication des souches de laboratoire, notamment des souches résistantes aux traitements par les HAART. Il s'agit d'un composé chef de file qui est administré par voie orale chez les rongeurs. Le AK602, composé dérivé, bloque l'infection à des concentrations nanomolaires in vivo (souris SCID) et in vitro **(108)**. Il semblerait que le mode d'action soit différent de celui du TAK-779 et du SCH-C. De nombreux composés sont à l'étude actuellement, mais il est impossible de les citer tous **(109,110)**.

2.4 Outils de biologie moléculaire

2.3.1 Extraction / Purification de ADN (111)

L'ADN (ou l'ARN) doit impérativement être purifié à partir de matériels biologiques dans des conditions optimales de qualité et de quantité. Dans la pratique, les acides nucléiques sont souvent extraits du sang total. Le procédé classique est l'extraction par le couple phénol-chloroforme. Le phénol est un excellent agent dénaturant des protéines et il permet de séparer efficacement les protéines et les acides nucléiques. Il est ensuite éliminé par l'extraction avec du chloroforme (non miscible avec l'eau). La séparation des phases aqueuse et organique peut se faire par centrifugation. La phase aqueuse contient les acides nucléiques. Des traitements par des agents clivant les protéines (protéolyse) peuvent être nécessaires. Les acides nucléiques peuvent être finalement récupérés sous forme solide à la suite de précipitation par l'alcool éthylique ou par l'alcool isopropylique. De nombreux réactifs sont disponibles, prêts à l'emploi, ce qui permet de simplifier les opérations de purification. Il est possible d'extraire les acides nucléiques à partir d'échantillons biologiques variés: cultures cellulaires, tissus divers etc...Les méthodes d'extraction doivent bien entendu être adaptées aux quantités disponibles de matériel biologique

2.3.2 Dosage et Conservation (111)

2.3.2.1 Estimation des quantités d'ADN

Cette estimation est indispensable après extraction d'ADN à partir d'un matériel biologique. La méthode basée sur la spectrophotométrie reste la plus utilisée.

Le dosage s'effectue par spectrophotométrie dans l'ultraviolet à 260 nm. Il est indispensable de mesurer également l'absorption à 280 nm. Cette dernière longueur d'onde permet d'estimer la contamination éventuelle de l'extrait par des protéines. L'absorption se définit par l'unité de densité optique mesurée à 260 nm.

Une unité de densité optique à 260 nm correspond à l'absorption d'une solution d'ADN double brin à la concentration de 50 µg/ml ou à l'absorption d'une solution d'ADN simple brin à la concentration de 33 µg/ml ou encore à de l'ARN à 40 µg/ml.

2.3.2.2 Conservation de l'ADN

Le stockage des acides nucléiques se fait au froid

- Pour un stockage à court terme, l'ADN est gardé à +4°C
- Pour un stockage à long terme, l'ADN est placé à -20°C ou -80°C

2.3.3 Electrophorèse (111)

C'est une technique qui permet de séparer des molécules en fonction de leur taille et de leur charge en utilisant un courant électrique. On peut ainsi analyser et purifier dans un milieu gélifié (gel d'agarose, gel de polyacrylamide...) l'ADN, l'ARN, les protéines.

➤ Migration électrophorétique des fragments d'ADN

Les fragments d'ADN après PCR ou digestion par les enzymes de restriction peuvent être séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose. Dans ce type de gel, les migrations des fragments d'ADN dépendent de la taille du fragment plus que de la charge de celui-ci. Plus le fragment a une taille élevée, moins la migration électrophorétique par rapport au puits d'inclusion sera importante. A l'opposé les fragments de petite taille auront une distance de migration la plus élevée. La détermination précise des tailles des fragments séparés par électrophorèse est effectuée en faisant migrer des marqueurs de poids moléculaire en parallèle avec les échantillons à analyser. La détection de l'ADN sur ce type de gel est réalisée

par exposition aux rayons UV après réaction avec un réactif spécifique (bromure d'éthidium par exemple, agent s'intercalant entre les brins d'ADN).

L'électrophorèse des fragments d'ADN en gel d'agarose permet des séparations jusqu'à 20-25 kb (20000-25000 pb). Le tampon utilisé pour la migration électrophorétique a un pH basique (par exemple: 8,3 dans le cas du tampon appelé TBE = Tris-Borate-EDTA).

Des fragments d'ADN de taille restreinte (inférieure à 1000 paires de bases) peuvent aussi être séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

2.3.4 Amplification in vitro du matériel génétique (PCR) (111)

2.3.4.6 Principe et concepts de base de la PCR

La PCR est une méthode permettant la multiplication d'une courte séquence d'ADN (jusqu'à 2 ou 3 Kb en routine) appelée séquence cible, à partir d'une infime quantité d'ADN génomique. Elle est même possible à partir de l'ADN génomique issu d'une cellule unique. Elle est réalisée dans un microtube en quelques heures.

Le taux de multiplication (ou taux d'amplification) est tel que la réaction revient à rendre négligeable le reste du génome qui n'a pas été amplifié car le produit de PCR contient presque exclusivement des millions d'exemplaires de la séquence cible. Il est donc facilement analysable par exemple sur un gel d'électrophorèse en fluorescence UV sans avoir à rechercher spécifiquement la séquence cible par hybridation moléculaire comme c'était le cas auparavant (technique de Southern). La PCR est utilisée dans la très vaste majorité des diagnostics moléculaires.

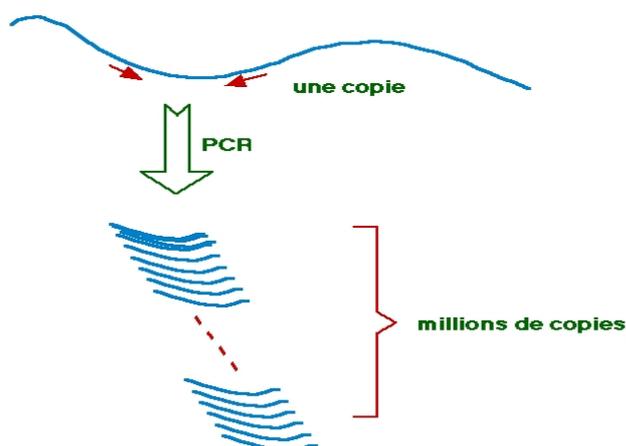


Figure 9 : Principe de PCR (112)

2.3.4.1 La réaction de PCR

La séquence cible est multipliée par synthèses successives à l'aide d'amorces oligonucléotidiques et d'une ADN polymérase thermostable. Chaque synthèse ou cycle de PCR est constituée de 3 étapes constituées de trois plateaux de température différents :

Dénaturation (autour de 95°C)

Hybridation des amorces (entre 50 et 60°C)

Polymérisation (autour de 72°C).

Chaque cycle dure quelques minutes. La séquence cible étant doublée à chaque cycle, le taux d'amplification (théorique) est de 2^n , si bien qu'après une trentaine de cycles de PCR, le nombre de copies de la séquence cible est plusieurs dizaines de millions de fois supérieur à n'importe quelle autre séquence du génome. Cette surreprésentation la rend facilement analysable et manipulable.

La PCR est une technique incomparablement plus rapide que d'autres techniques telles que la méthode de Southern ou le clonage. Il faut deux ou trois heures pour réaliser une PCR.

Le milieu réactionnel doit contenir :

- l'ADN contenant la séquence à amplifier; il peut s'agir de l'ADN génomique d'un patient pour lequel on cherche à réaliser le diagnostic moléculaire d'une maladie génétique, d'ADN plasmidique contenant une séquence d'intérêt etc...
- les deux amorces oligonucléotidiques monobrins complémentaires chacune d'une des extrémités du fragment à amplifier 5'-3' et 3'-5'
- des désoxynucléotides libres dATP, dCTP, dGTP, dTTP qui sont incorporables pour former le brin d'ADN néosynthétisé.
- l'enzyme permettant la synthèse d'un néo brin à partir des amorces ; il s'agit d'une ADN polymérase thermostable, par exemple la Taq DNA polymerase issue du micro-organisme *Thermus Aquaticus*.
- du MgCl₂ et une solution donnant au milieu réactionnel un PH et une concentration saline optimale pour le fonctionnement de l'enzyme. Le tube contenant le milieu réactionnel est placé dans un appareil appelé « thermocycleur », sorte de plaque chauffante programmable en temps et en température et disposant de délais de montée et de descente en température extrêmement courts. Il délivre à chaque instant au milieu réactionnel une température donnée permettant la réalisation de l'une des trois étapes du cycle de PCR : dénaturation, hybridation ou synthèse.

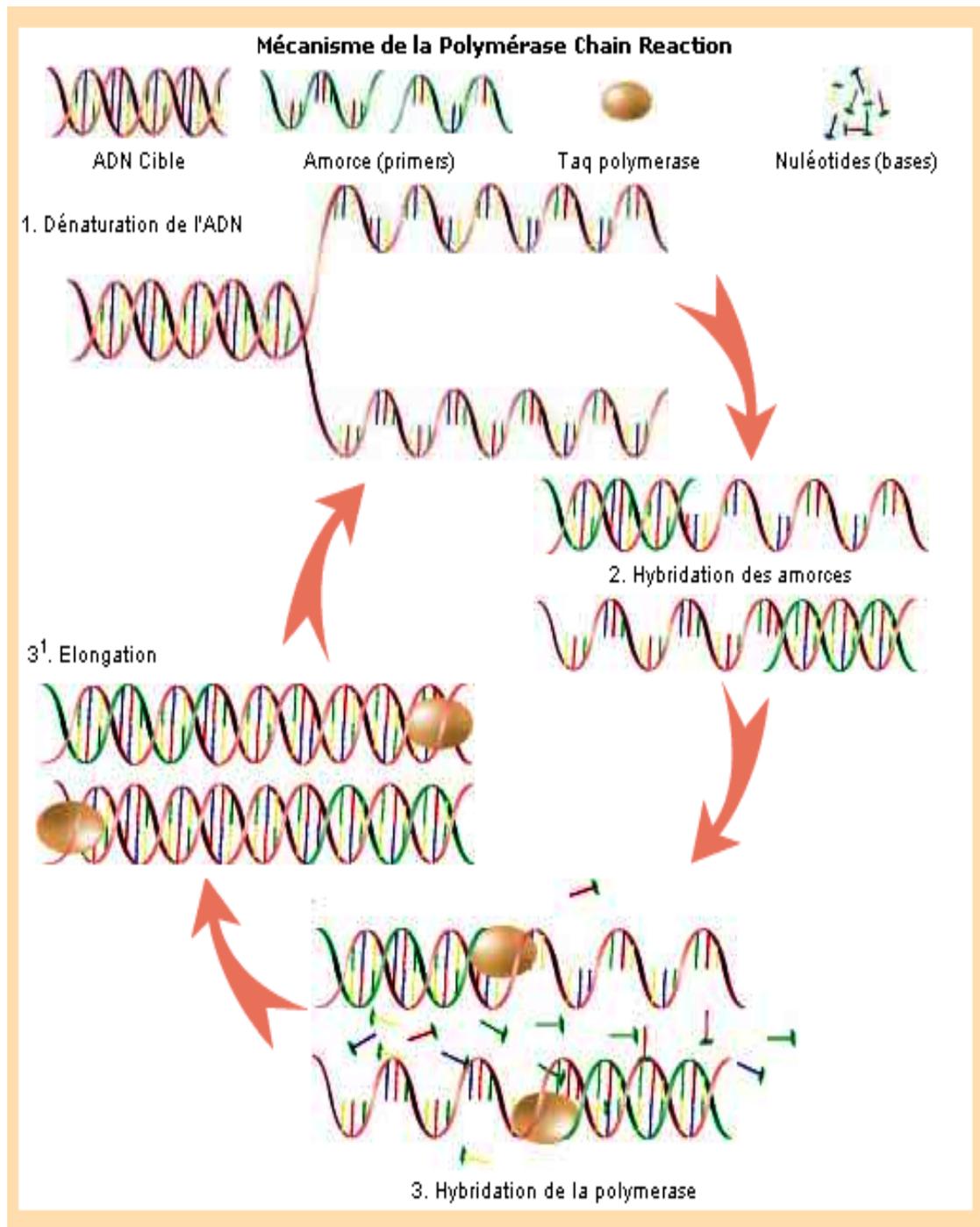


Figure 10: Mécanisme de la réaction de PCR.

2.3.4.2 Les variants de la PCR (111)

Cette technique a évolué considérablement. De nouveaux types de PCR ont été introduits. Nous citerons brièvement :

- **La PCR dite " Multiplex "** pour amplifier des gènes avec de nombreux exons (le gène CFTR impliqué dans la mucoviscidose possède 27 exons) ou plusieurs gènes différents simultanément. Il est en effet possible d'introduire dans le milieu d'amplification des couples d'amorces spécifiques différentes et ce sans compétition entre ces amorces.

- **La PCR dite " Nested PCR "**. Elle fait intervenir une seconde PCR réalisée en utilisant des nouvelles amorces situées à l'intérieur du domaine défini par les amorces de la première PCR et a pour objectif d'améliorer la spécificité.

- **La PCR quantitative.** Dans ce type de PCR, on cherche à estimer le nombre de copies présent dans la séquence cible d'ADN ou d'ARN. La proportionnalité entre le nombre d'amplifications et le nombre de copies n'est valable que pour un nombre de cycles PCR faible.

2.3.4.4 Utilisations des produits PCR (111)

Les utilisations des produits PCR sont très variées, nous citerons quelques exemples (cette liste n'est pas exhaustive) :

- Mise en évidence de mutations ponctuelles par hybridation des produits PCR avec des sondes oligo-nucléotidiques (technique dite du "dot-blot").
- Analyse de restriction.
- Introduction du produit PCR dans un vecteur: clonage du produit PCR
- **Séquençage direct du produit PCR.**
- Analyse électrophorétique des produits PCR: technique DGGE et technique SSCP.

2.3.4.5 Les limites de la PCR

- La PCR suppose la synthèse chimique de deux oligonucléotides utilisés pour l'amorçage de la réaction. Il faut donc que la séquence nucléotidique du fragment à analyser soit connue au niveau de ces régions d'amorçage. Il est néanmoins possible de contourner le problème en clonant le fragment dont la séquence est totalement inconnue dans un vecteur (plasmide, bactériophage ...) afin d'utiliser la séquence (connue) du vecteur pour amorcer la réaction de PCR. L'avantage de cette méthode par rapport à la multiplication par clonage est sa simplicité et sa rapidité.
- La taille du fragment à amplifier ne peut pas dépasser quelques kilobases. Au-delà, il se produit des phénomènes qui empêchent la réaction de se faire normalement : interruptions prématurées dues à la formation de structures secondaires, ré appariement des fragments néo synthétisés entre eux etc...
- Le taux d'amplification est théoriquement de 2^n (exposant) n mais en pratique le rendement de la réaction n'est jamais de 100%.
- Au-delà d'un certain nombre de cycles, le taux d'amplification baisse progressivement pour tendre vers 1. Ceci est dû à une diminution de la concentration des désoxynucléotides et des oligonucléotides et à l'augmentation de la concentration du produit de PCR.

2.3.5 Séquençage de l'ADN (111,112)

2.3.5.1 Principe

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre des nucléotides sur la molécule d'ADN. C'est le niveau de résolution le plus élevé pour rechercher la présence de mutations ponctuelles dans un gène. La méthode utilisée aujourd'hui, proposée par F. Sanger en 1977 (prix Nobel de chimie en 1980), repose sur l'utilisation de nucléotides particuliers appelés didésoxynucléotides, qui bloquent la

synthèse d'ADN par les ADN polymérasés après leur incorporation. Ce blocage est dû à l'impossibilité qu'ont ces nucléotides de former une liaison phosphodiester avec un autre nucléotide en raison de l'absence du groupement hydroxyle sur le carbone 3'. Depuis 1977, la méthode a considérablement évolué grâce à la mise au point de séquenceurs automatiques et de marquages des nucléotides à l'aide de fluorochromes. Elle est devenue aujourd'hui une technique rapide et fiable utilisée fréquemment dans le diagnostic des maladies héréditaires. Elle reste néanmoins coûteuse et réservée à des gènes constitués d'exons en nombre limités et de petites tailles.

2.3.5.2 La réaction du séquençage

Le fragment d'ADN à séquencer (il peut s'agir par exemple d'un exon du gène d'intérêt) est obtenu par PCR puis mis en présence d'un milieu réactionnel contenant :

- l'amorce à partir de laquelle la synthèse du néobrin sera réalisée par une ADN polymérase,
- les 4 désoxynucléotides (dA, dT, dC, dG),
- les 4 didésoxynucléotides (ddA, ddT, ddC, ddG) marqués chacun par un fluorochrome distinct
- une ADN polymérase (en général la Taq DNA polymérase).

L'ensemble est soumis à une succession de cycles de polymérisation au cours desquels l'ADN polymérase peut, au niveau de chaque nucléotide de l'ADN matrice, incorporer un désoxynucléotide ou un didésoxynucléotide. Dans le cas où elle incorpore un désoxynucléotide, la synthèse peut continuer, dans le cas contraire elle s'arrête. Ce choix étant aléatoire, chaque base de l'ADN matrice aura statistiquement vu un certain nombre de fois l'incorporation d'un

didésoxynucléotide, si bien que le milieu réactionnel contient l'ensemble des molécules néosynthétisées possibles. Ces molécules sont ensuite dénaturées puis migrées dans un gel d'électrophorèse afin d'être séparées selon leur taille. On peut ainsi reconstituer la séquence en analysant la nature du fluorochrome terminant chacun de ces fragments néosynthétisés, du plus petit (premier nucléotide de la matrice) au plus grand (dernier nucléotide de la matrice).

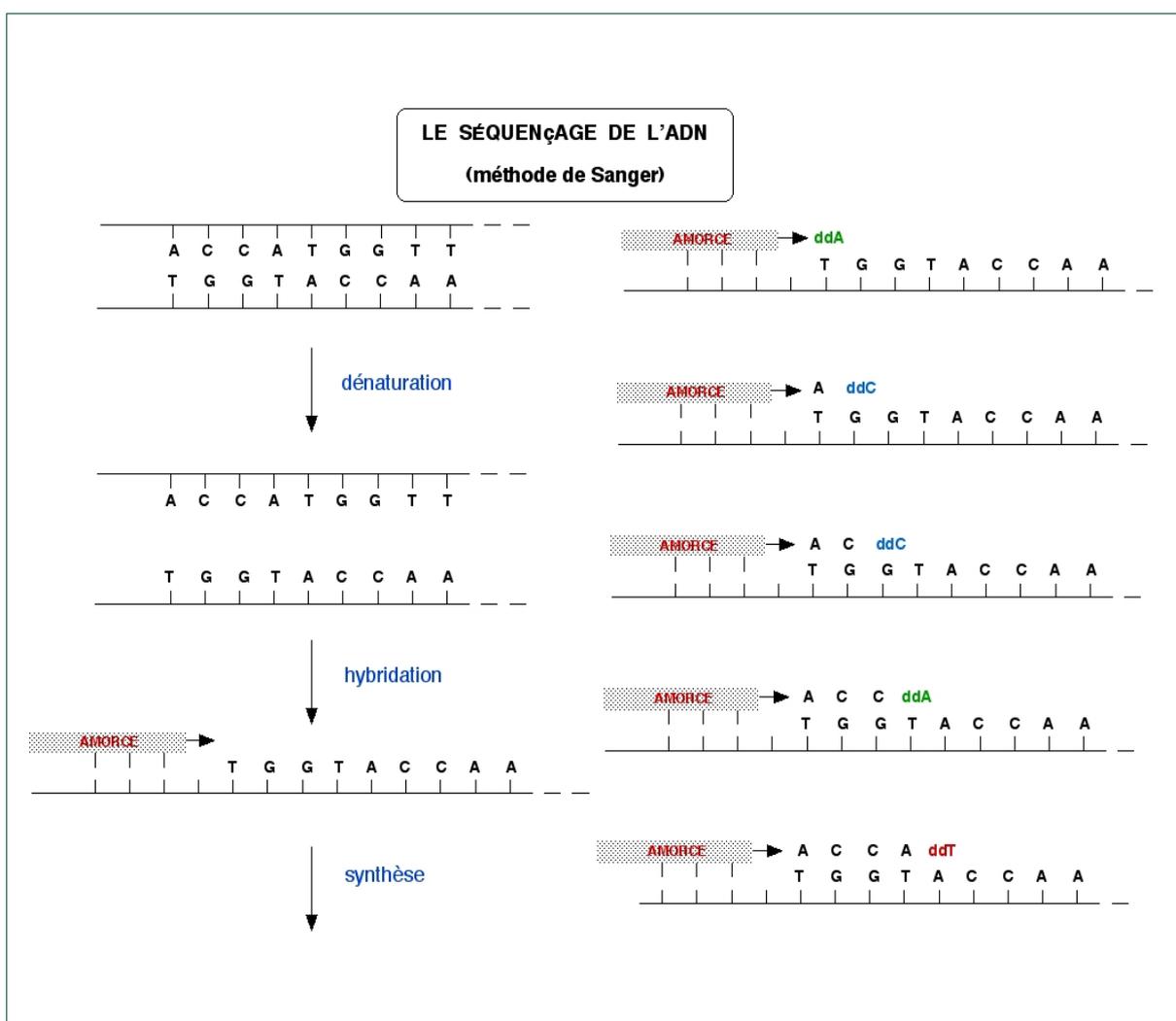


FIGURE 11: Principe du séquençage de l'ADN

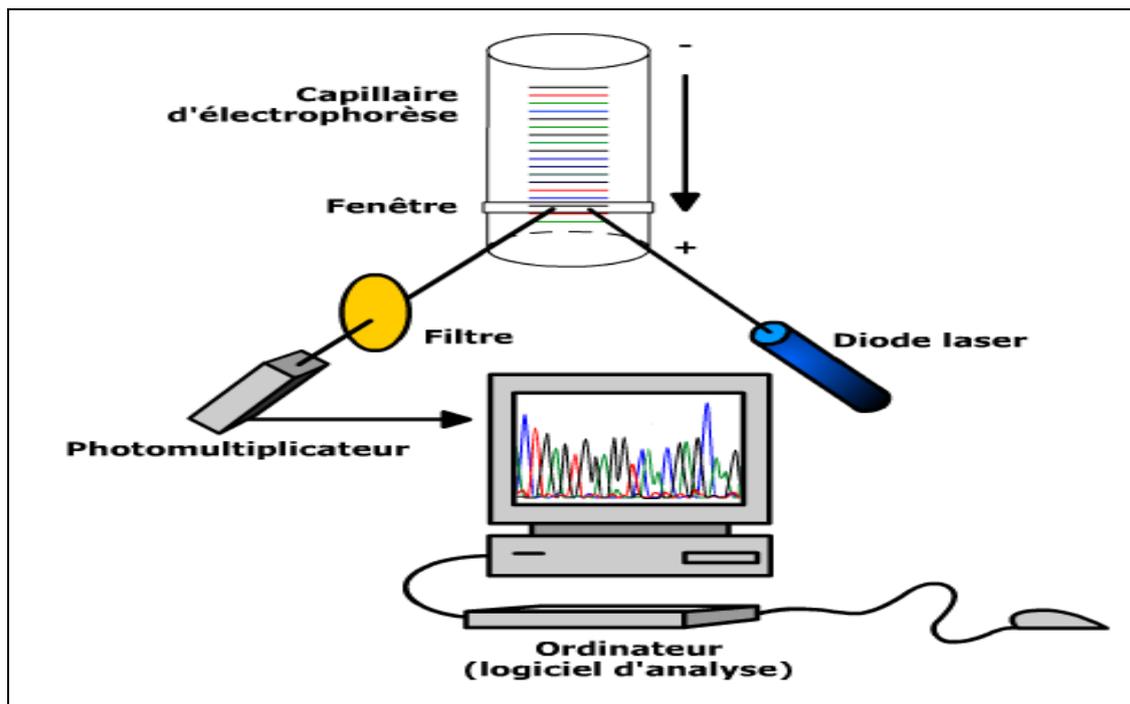


FIGURE 12 : Fonctionnement du séquenceur capillaire.

2.4 Outils bioinformatique d'analyse des séquences D'ADN

2.4.1 Objet de la bioinformatique (113)

Discipline basée sur les acquis de la biologie, des mathématiques, et de l'informatique. Elle consiste en l'ensemble des méthodes et programmes pour **gérer, organiser, comparer, analyser, explorer, l'information génique et génomique** stockée dans les bases de données dans le but de prédire et produire de nouvelles connaissances et de développer aussi de nouveaux concepts.

2.4.2 Analyse de séquences

L'analyse bioinformatique fondamentale et principale réalisée sur les séquences d'ADN est l'alignement. Il s'agit de comparer des séquences grâce à des algorithmes.

2.4.3 Objet de l'alignement :

Un alignement de séquences est réalisé en générale pour :

- Quantifier et localiser la similarité
- Trouver la meilleure mise en correspondance des résidus qui conserve l'ordre des séquences. (score de l'alignement)
- Prendre en compte des mutations ponctuelles qui se résument en trois événements majeurs : *Insertion Déletion Substitution*

2.4.4 Points essentiels d'un alignement :

La démarche d'évaluation d'un alignement comporte quatre points essentiels :

- 1- Le type de l'alignement
- 2- Le schéma de score
- 3- L'algorithme d'alignement
- 4- La méthode statistique permettant de quantifier la qualité de l'alignement

2.4.5 Différents types d'alignements

Un alignement concerne au minimum une paire de séquences. Au delà on parle d'**alignement multiple**. Les principes et les bases méthodologiques d'analyse de l'alignement d'une paire de séquences sont généralement extrapolés à l'alignement multiple. L'alignement peut aussi être qualifié de **global** ou **local** selon qu'il concerne toute la longueur des séquences ou juste des zones précises.

2.4.6 Applications pratiques de l'analyse des séquences

2.4.6.1 Recherche de similarités :

La recherche de similarité consiste à trouver à partir d'une séquence dite <<requête>> toutes les séquences similaires contenues dans une base de données. (Banques de séquences).

L'utilisation des méthodes d'alignement deux à deux devient ainsi très fastidieuse dès lors que le nombre de séquences est élevé. En plus cela nécessiterait une taille de mémoire informatique trop importante.

Des outils bioinformatiques plus appropriés à ce type d'analyse ont donc été développés; il s'agit d'ensembles de programmes informatiques combinés aptes à exécuter facilement et rapidement tous les types de comparaisons.

Les résultats sortent sur des interfaces sous forme de liste de séquences similaires et d'alignements. La qualité des alignements (scores), les homologies et les divergences sont également disponibles.

Les outils les plus utilisés sont :

-**Méthode FASTA** (FAST All), algorithme élaboré par Pearson et Lipman en 1988.

- **Méthode BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool) élaboré par Altschul et al en 1990.

Ces programmes ont depuis évolués pour aboutir à des versions beaucoup plus améliorées et surtout d'utilisation plus facile.

➤ **Programme NCBI BLAST version N 2.2.13**

Programme de recherche de similarités locales entre des séquences requêtes et celles des bases de données nucléotidiques internationales. Ce programme est mis en ligne via le site du National Center for Biotechnology Information (NCBI) et le National Institute of Health (NIH).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>

Les séquences de référence sont issues des bases de données suivantes:

GenBank (NIH-NCBI,USA) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>

EMBL (European Molecular Biology Laboratory) <http://www3.ebi.ac.uk/Services/DBStats>

DDBJ (DNA Data Bank of Japan) <http://www.ddbj.nig.ac.jp>

PDB (Protein Data Bank) <http://www.rcsb.org/pdb>

2.4.6.2 Comparaison de plusieurs séquences (alignement multiple)

L'alignement multiple des séquences a pour but de:

- Analyser des résultats de séquençage
- Identifier des motifs conservés dans un ensemble de séquences. Ces motifs pouvant être critiques pour la fonction biologique.
- Procéder à des analyses phylogénétiques c'est-à-dire révéler des relations évolutives entre séquences voire entre organismes.
- Localiser des structures 2D et 3D communes. (Séquences amino acides)
- caractériser un gène ou une protéine. La caractérisation étant utile pour identifier de nouvelles structure.

L'outil le plus utilisé pour l'alignement multiple est le programme **CLUSTAL W** développé par Thompson et al (1994).

La version 1.83 de CLUSTALW est un programme d'alignement multiple local et global de séquences nucléotidiques ou protéiques développé par Thompson et al (1994). Ce programme est accessible en ligne (internet) via le site du European Molecular Biology Laboratory et le European Bioinformatique Institute. (EMBL-EBI) <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>

MÉTHODOLOGIE

4 MÉTHODOLOGIE

4.1 Cadre et lieu de l'étude

La présente étude s'est déroulée au Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée (LBMA) de la faculté des sciences et techniques de l'université de Bamako.

Le laboratoire est composé des unités de parasitologie moléculaire, de biotechnologies végétales et de virologie moléculaire où nos travaux furent menés. Les recherches qui y sont menées portent sur le VIH/SIDA, le paludisme, les hémoglobinopathies, le déficit en G6PD, les oncogènes, les biotechnologies animale et végétale.

Cette étude s'inscrit dans un cadre global de recherche sur le VIH/SIDA dont les grands axes sont la diversité génétique du virus, les interactions virus - cellules cibles de hôte, la génétique de la réponse immunitaire, la génétique de résistance aux ARV et la recherche vaccinale.

Le génotypage de CCR5 est l'étape initiale d'un ensemble d'études qui à terme permettront l'exploration des allèles impliqués significativement dans la génétique de la résistance VIH/SIDA. Ces allèles sont entre autres CCR2 64I, SDF1-3'A et les allèles HLA de classe I et II.

4.2 Type et période d'étude

Il s'agit d'une étude prospective qui s'est déroulée de Janvier 2004 à Novembre 2005.

4.3 Populations d'étude

4.3.1 Description et critères d'inclusion

Notre étude a porté sur des échantillons d'ADN issus de trois groupes de sujets ci-dessous caractérisés:

- Les malades du SIDA hospitalisés ou venant en consultation aux services des maladies infectieuses de l'Hôpital National du Point G (HNPG) durant la période d'étude. La date probable de contamination étant inférieure à dix ans.

L'identification de ces sujets est faite par l'extension « hpg » précédé du numéro de l'échantillon.

- Des sujets séropositifs pour le VIH-1 et asymptomatiques représentés par des donneurs volontaires de sang fréquentant le centre national de transfusion sanguine (CNTS) dont la sérologie VIH-1 s'est avérée positive.

L'identification de ces sujets est faite par l'extension « cnts » précédé du numéro de l'échantillon.

- des sujets séronégatifs à risque représentés par les enfants nées de mères séropositives sous PTME à la Névirepine dont la PCR *Env* s'est avérées négative. Ces sujets fréquentaient l'Hôpital Gabriel Touré. (HGT)

L'identification de ces sujets est faite par l'extension « hgt » précédé du numéro de l'échantillon.

4.3.2 Effectifs

Les effectifs des trois populations de l'étude étaient les suivants :

100 sujets malades du SIDA.

30 sujets séropositifs asymptomatiques.

100 sujets séronégatifs exposés.

3.3.3 Critères de non inclusion

Les patients infectés par le VIH-2 ou co-infectés par les deux types de VIH n'étaient pas inclus dans l'étude.

3.4 Méthodes de l'étude

3.4.1 Marqueurs moléculaires utilisés

3.4.1.1 Synthèse

Les marqueurs moléculaires sont des oligonucléotides de synthèse utilisés comme amorces dans la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

Les amorces sont conçues de sorte à pouvoir s'hybrider complémentirement en 5' 3' et en 3' 5' à des séquences spécifiques du gène étudié délimitant ainsi la portion à amplifier. Dans cette étude, les amorces utilisées isolent une portion de l'exon 4 du gène *CCR5* contenant le site de la délétion $\Delta 32$. La taille potentielle du fragment amplifié est dépendante du génotype de *CCR5*. Ainsi nous avons 189 pb pour le génotype homozygote sauvage, 157 pb pour le génotype homozygote muté et deux fragments de 189 et 157 pb pour le génotype hétérozygote. (7)

Les amorces ont été synthétisées par la firme IDT (Integrated DNA Technologies, Inc.) conformément aux séquences fournies. (Annexe 1)

TABLEAU VIII: Séquence des amorces pour le génotypage de CCR5

Amorces	Séquences	Taille de l'amplicon (pb)	
		Délétion $\Delta 32$ présente	Délétion $\Delta 32$ absente
Aller	5' CAAAAGAAGGTCTTCATTACACC 3'	157	189
Retour	5' CCTGTGCCTCTTCTTCTCATTTTCG 3'		

3.4.1.2 Dilution des amorces

Les amorces sont livrées sous forme lyophilisée d'où la nécessité d'une dilution afin d'obtenir des concentrations optimales pour la PCR.

La dilution des amorces s'est donc faite par ajout d'un volume adéquat d'eau ultra pure de sorte à obtenir une molarité finale de 50mM.

3.4.2 Matériel biologique

3.4.2.1 Isolement des cellules mononuclées du sang périphérique

A partir de prélèvement de sang total périphérique sur anticoagulant (Citrates de Sodium), les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) ont été isolées par gradient de Ficoll (Sodium diatrizoate polysucrose, Lymphoprep™). Les gradients de ficoll sont utilisés pour séparer les cellules ayant différentes densités et en particulier pour purifier les lymphocytes et les monocytes. Après centrifugation les globules rouges et les polynucléaires plus denses que le ficoll, sédimentent au fond du tube alors que les cellules mononuclées forment un anneau surnageant le ficoll. Les PBMCs sont délicatement recueillies et lavées au PBS 1X (*Phosphate Buffered Saline 1X, 7.4, GIBCO™*) afin d'éliminer les plaquettes et les résidus de plasma. **(Protocole détaillé en Annexe 2 A)**

3.4.2.2 Extraction et quantification de l'ADN génomique :

L'extraction de l'ADN génomique fut effectuée à partir des cellules mononuclées du sang périphérique. Le Kit *GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma, St Louis, Mo)* fut utilisé. Après extraction, l'ADN fut quantifié par spectrophotométrie (*BIOphotometer, eppendorf*) et stocké -20°C jusqu'au moment de la PCR. Le stockage de longue durée a été fait à -80°C.

(Protocole détaillé en Annexe 2 B).

3.4.3 Génotypage de CCR5

A partir de l'ADN génomique, le génotypage de l'allèle $\Delta 32$ a été fait par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) d'une portion du gène CCR5 donnant lieu à l'obtention potentielle d'un fragment de 189 pb pour l'allèle sauvage, 157 pb pour l'allèle muté et deux fragments de 157 et 189 pb en cas d'hétérozygotie.

3.4.3.2 Les conditions de la PCR

➤ Les amorces

Les amorces utilisées avaient respectivement pour séquences

[5' CAA AAA GAA GGT CTT CAT TAC ACC 3'] pour l'amorce aller

[5' CCT GTG CCT CTT CTT CTC ATT TCG 3'] pour l'amorce retour (7)

➤ Le mélange réactionnel

Pour chaque échantillon les proportions des réactifs constituant le mélange réactionnel de 25 μ l de volume final sont résumées dans le tableau ci-dessous.

TABLEAU IX: Réactifs de la PCR.

Amorce retour Réactifs	50mM Concentration initiale	1 mM Concentration finale	0.5 Volume prélevé
ADN	(conditionnement)		2.5 (μ l)
Eau stérile	-	-	15.75
Tampon PCR	10X	1X	2.5
MgCl ₂	50mM	1.5 mM	1
DNTPs	10mM	0.2 mM	2
Taq DNA Polymérase	5U	0.05 U/ μ l	0.25
Amorce aller	50mM	1 mM	0.5

➤ **Le programme d'amplification**

Le programme d'amplification comportait une dénaturation initiale à 94 °C pendant 1 min, une dénaturation à 94 °C pendant 20 s, l'hybridation des amorces à 57 °C pendant 30 s et une élongation à 72 °C pendant 30 s. Ce cycle fut accompli 35 fois suivi d'une phase dite « extra time » de 72 °C pendant 10 min. La machine PCR utilisée était du type *PTC-200 DNA Engine Cycler (MJ Research)*.

3.4.3.3 Electrophorèse et estimation de la taille des produits de PCR

Après la PCR, les amplicons ont subi une électrophorèse sur gel d'agarose 2% contenant du bromure d'éthidium à 0,3 µl /ml. 15 µl des produits amplifiés furent logés dans les puits du gel, préalablement mixés à 3 µl de tampon de chargement communément appelé DYE (bleu de bromophénol 0, 25% Sucrose 40% et eau distillée). Le marqueur moléculaire de taille V ou VI (*Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN*) fut également logé dans le gel parallèlement aux amplicons.

L'électrophorèse fut faite à 150 V pendant 45 min dans du TBE 0.5X comme tampon de migration. Le dispositif était composé d'une cuve d'électrophorèse (*Wide mini sub® Cell GT, Biorad*) reliée à un générateur (*Power Pac 200, Biorad*).

Le gel fut enfin révélé sous lumière Ultra Violette puis photographié et analysé grâce à un dispositif composé d'une chambre à UV surmontée d'une caméra numérique, le tout relié à un ordinateur contenant le logiciel de capture d'images et d'estimation de la taille des fragments d'ADN (*Kodak EDAS 290 1D version 3.5.4*).

3.4.4 Exploration du polymorphisme nucléotidique de CCR5

Environ 5% des amplicons (12/230) de la PCR de génotypage furent sélectionnés par tirage aléatoire et séquencés selon la méthode automatique directe

par électrophorèse de capillarité suivie d'une analyse bioinformatique des séquences obtenues.

3.4.4.1 Séquençage automatique direct

Le séquençage fut mené selon le protocole suivant :

➤ **Purification d'ADN à partir du gel d'agarose**

Les fragments d'ADN du gène *CCR5* sous forme bandes claires et denses ont été découpés du gel d'agarose et purifiés. Nous avons utilisé le kit *MinElute™ Gel Purification Kit (Qiagen®)*.

(Protocole détaillé en Annexe 2 C)

➤ **PCR de pré séquençage**

L'ADN pur extrait du gel fut utilisé comme matrice, les amorces et le programme d'amplification furent les mêmes que ceux de la PCR de génotypage. Les autres réactifs provinrent du Kit *Beckmann Coulter GenomeLab™ DTCS Quick START*.

La composition du mélange réactionnel pour un échantillon est résumée dans le tableau X.

TABLEAU X: Mélange réactionnel de la PCR de séquençage

ADN	3 µl
Amorce (aller ou retour)	1 µl
DTCS Quick Start Ceq Master Mix (Tampon, dNTPs, ddNTPs, ADN polymérase)	4 µl
Eau ultra pure	2 µl
Total	10 µl

➤ **Purification des amplicons**

Cette étape a pour but de purifier les produits de PCR par un système de gel filtration sur une résine poreuse. La résine Sephadex[®] G50 utilisée permet de désaler les échantillons et d'éliminer les nucléotides non incorporés de même que l'excès d'amorces. La limite d'exclusion de la résine G50 est d'environ 20 bases.

La plaque 96 puits Millipore 1509 de MultiScreen[®] fut utilisée comme support inerte de la résine G50. Après filtration, le volume récupéré est d'environ 15 µl contre 20 µl au départ.

(Protocole détaillé en Annexe 2 D)

➤ **injection dans le séquenceur capillaire**

Les produits purifiés furent transférés dans une plaque de polypropylène au format standard du séquenceur (96 wells plate, cone 25PKG). 25 µl de solution de chargement [Sample Loading Solution (SLS), Beckman Quick Start Kit] ont été ajoutés à chaque échantillon.

Après homogénéisation, une goutte d'huile minérale fut ajoutée avant introduction dans le séquenceur automatique afin d'empêcher d'éventuelles évaporations.

La plate forme utilisée pour le séquençage est composée des éléments suivants :

- Le séquenceur *CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckmann Coulter)*
- L'unité centrale (CPU) contenant le logiciel de fonctionnement et d'analyse :
CEQ™ 8000 Genetic Analysis System (Beckmann Coulter)
- Le moniteur d'interface sur lequel s'affiche les informations en temps réel.

➤ **Analyse des séquences**

Deux programmes ont été utilisés :

- **NCBI BLAST version N 2.2.12** (Basic Local Alignment Search Tool)

Programme de recherche de similarités entre des séquences soumises et celles des bases de données nucléotidiques internationales. Ce programme fut exécuté en ligne via le site du National Center for Biotechnology Information (NCBI) et du National Institute of Health (NIH). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>

Les séquences de référence sont issues des bases de données suivantes:

GenBank (NIH-NCBI, USA) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>

EMBL (European Molecular Biology Laboratory)

<http://www3.ebi.ac.uk/Services/DBStats>

DDBJ (DNA Data Bank of Japan) <http://www.ddbj.nig.ac.jp>

PDB (Protein Data Bank) <http://www.rcsb.org/pdb>

- **CLUSTAL W version 1.83** :

Programme d'alignements multiples locaux et globaux de séquences nucléotidiques ou protéiques développé par Thompson et al (1994).

Ce programme est accessible en ligne via le site du European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatique Institute. (EMBL-EBI)

<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>

Ce programme fut utilisé pour les analyses suivantes :

- La comparaison des séquences obtenues entre elles et avec une séquence de référence comme contrôle.
- Le calcul des homologies et les divergences des séquences.
- L'analyse phylogénétique des séquences

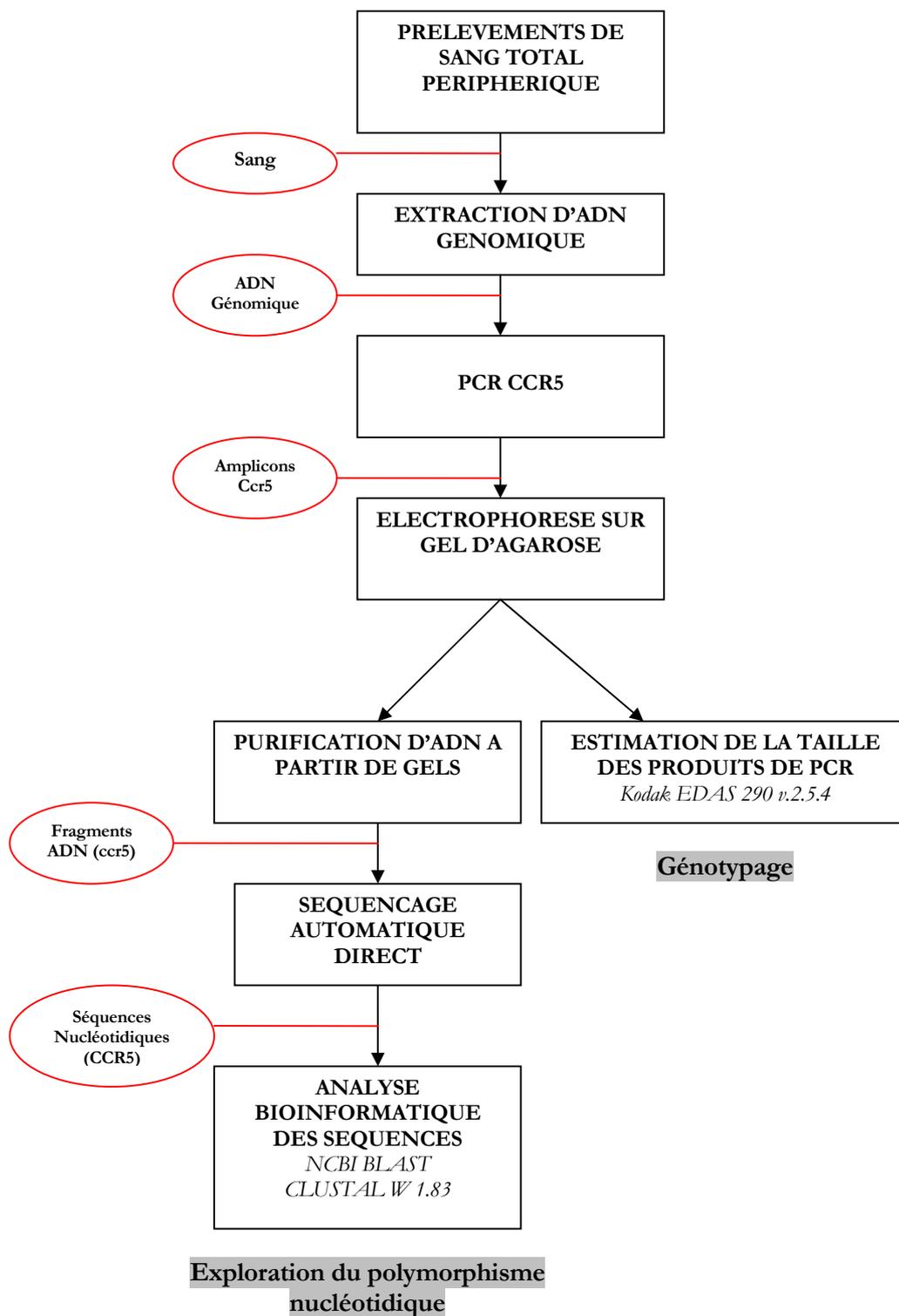


Figure 13 : Schématisation de la démarche méthodologique

RÉSULTATS
ET
COMMENTAIRES

4 Résultats et commentaires

A l'issue de la PCR sur les 230 échantillons de l'étude et du séquençage d'environ 5%, nous avons obtenues les résultats suivants :

4.1 Résultats de la PCR de génotypage

Un signal positif de la PCR fut obtenu pour tous les échantillons des trois populations de l'étude, soit un total de 230 amplicons.

Après électrophorèse sur gel d'agarose 2% et révélation sous lumière UV, il est ressorti que les profils de migration des amplicons issues des trois populations de l'étude sont identiques. On note une unique bande caractéristique pour chaque échantillon. (**Fig.14 A**)

A l'analyse des gels d'agarose avec le logiciel *Kodak EDAS 290 1D version 3.5.4* (**Fig 14 B**) taille moyenne de l'unique bande observée était comprise entre 187 et 193 pb. Soit une moyenne de 190 pb. Selon la conception des marqueurs moléculaires utilisés, cette taille très proche de 189 pb correspond à l'allèle sauvage de CCR5. L'unicité de la bande indiquant une homozygotie.

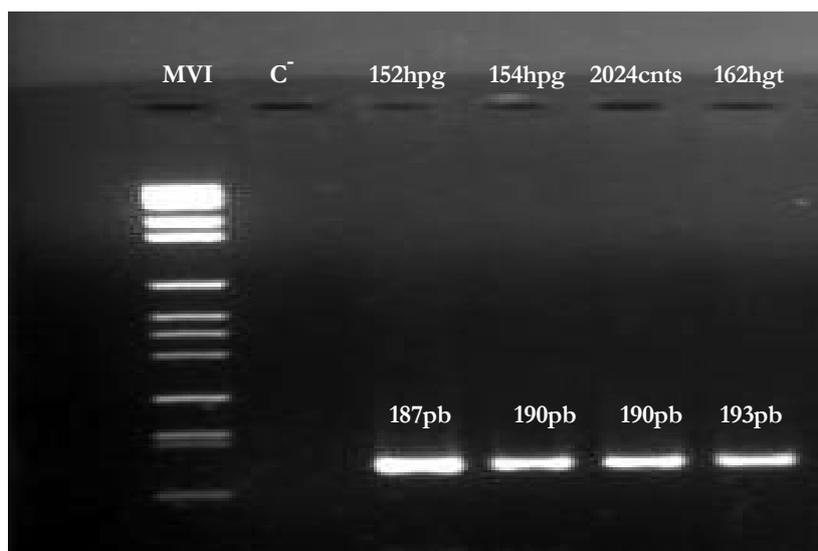


Figure 14 a : Gel d'agarose à 2% montrant l'amplification de CCR5.

Cette image montre la révélation sous lumière UV d'un gel d'agarose à 2% après électrophorèse des produits de PCR du gène CCR5 pour les échantillons 152hpg, 154hpg, 162hgt, 2024cnts respectivement logés dans les 3^e, 4^e, 5^e, 6^e puits.

Dans le premier puits le marqueur de taille VI. Le 2^e puit contenant le control négatif (Eau pure à la place de l'ADN) On remarque pour chaque échantillon une seule bande caractéristique.

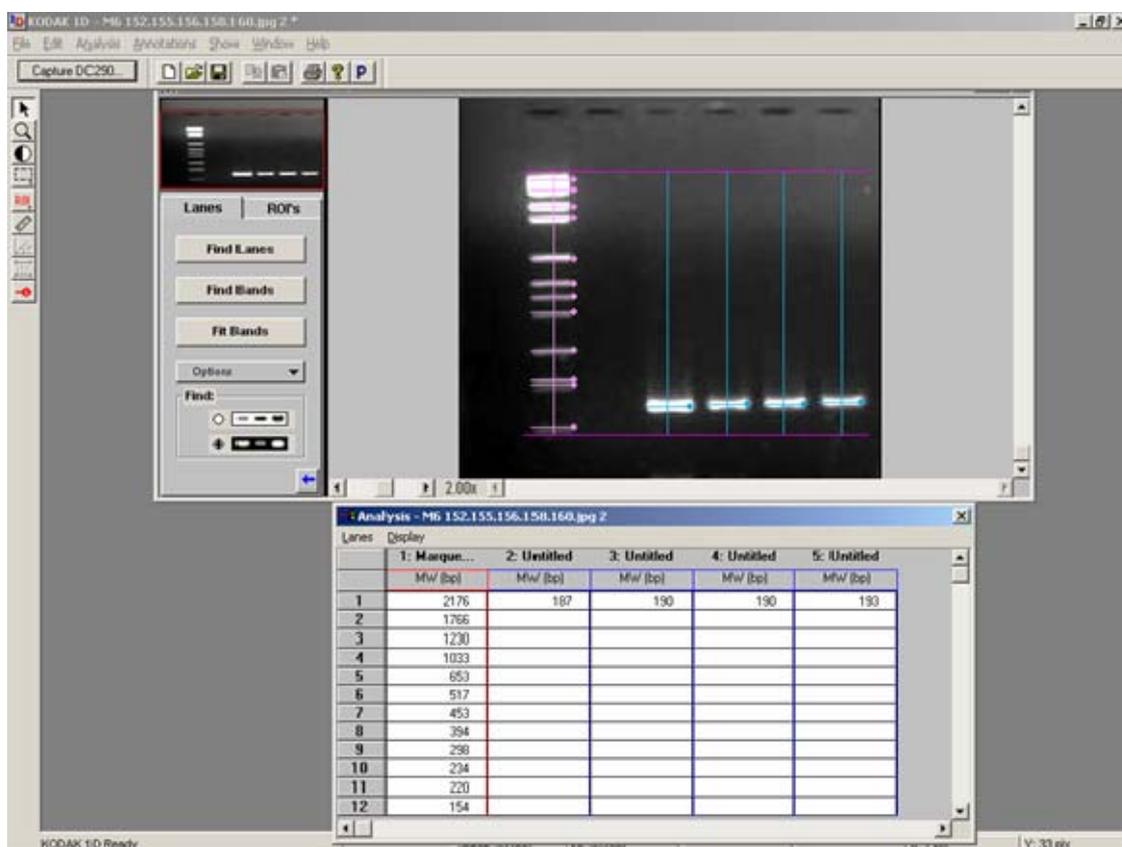


Figure 14 b : Analyse du gel de la figure 14a avec *Kodak EDAS 290 1D version 3.5.4*

Les fragments d'ADN pour les échantillons 152hpg, 154hpg, 162hgt et 2024cnts ont respectivement pour taille 187, 190, 190 et 193pb.

TABLEAU XI: Génotypage de CCR5 Δ 32.

GÉNOTYPE CCR5				
	Δ/Δ	$\Delta/+$	$+/+$	Total
HIV+ Malades du sida	0	0	100	100(100%)
HIV+ Asymptomatiques	0	0	30	30(100%)
HIV- exposés	0	0	100	100(100%)
	0	0	230	230 (100%)

Δ/Δ Homozygote mutant pour l'allèle Δ 32.

$\Delta/+$ Hétérozygote.

$+/+$ Homozygote sauvage

L'allèle normal (sauvage) de *CCR5* a été identifié chez tous les sujets inclus dans l'étude.

La mutation Delta 32 du gène codant pour le récepteur de chémokines CCR5 (corécepteur majeur d'entrée pour le VIH-1) n'a pas été détectée par la PCR chez l'ensemble des trois populations de l'étude de même que le génotype hétérozygote.

4.2 Résultats du séquençage automatique Direct :

Le séquençage par électrophorèse de capillarité a été utilisé pour l'évaluation du polymorphisme nucléotidique des amplicons de CCR5. Les résultats suivants ont été obtenus :

4.2.1 Séquences obtenues :

A l'issue du séquençage automatique direct, 12 séquences ont été obtenues. Soit 5% environs des échantillons. La répartition des séquences par populations est la suivante:

- 4 séquences chez les séropositifs asymptomatiques (**2024cnts, 2026cnts, 2029cnts, 2036cnts**)

-4 séquences chez les séropositifs malades du SIDA (**40hpg, 44hpg, 152hpg, 154hpg**)

-4 séquences chez les séronégatifs exposés (**106hgt, 136hgt, 138hgt, 162hgt**)

La taille des séquences obtenues varie de 182 à 192 pb avec une moyenne de 188 pb. (**Tab VII**)

TABLEAU XII : Séquences nucléotidiques de CCR5 obtenues à Bamako. .

Ech.	Statut VIH/SIDA	SÉQUENCES	Taille (pb)
136hgt	HIV- Exp.	CAAAAAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCTCATTITCCATACAGTCAGTATCAATTCGTGGAAGAATTTCCAGACATTAAGATAGTCATCTTGGGGGCTGTGCTCTGCCGCTGCTTGTTCATGGTCATCTGCTACTCGGGAATCCTAAAAACTCTGCTTCGGTGTCAAAATGAGAAGAAGAGGCACAGG	192
138hgt	HIV- Exp.	CAAAAAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCTCATTITCCATACAGTCAGTATCAATTCGTGGAAGAATTTCCAGACATTAAGATAGTCATCTTGGGGGCTGGTCTGCCGCTGCTTGTTCATGGTCATCTGCTACTCGGGAATCCTAAAAACTCTGCTTCGGTGTGCAAAATGAGAAGAAGAGGCACAGG	183
106hgt	HIV- Exp.	AAAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCTCATTITCCATACAGTCAGTATCAATTCGTGGAAGAATTTCCAGACATTAAGATAGTCATCTTGGGGGCTGGTCTGCCGCTGCTTGTTCATGGTCATCTGCTACTCGGGAATCCTAAAAACTCTGCTTCGGTGTGCAAAATGAGAAGAAGAGGCACAGG	186
162hgt	HIV- Exp.	CAAAAAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCTCATTITCCATACAGTCAGTATCAATTCGTGGAAGAATTTCCAGACATTAAGATAGTCATCTTGGGGGCTGGTCTGCCGCTGCTTGTTCATGGTCATCTGCTACTCGGGAATCCTAAAAACTCTGCTTCGGTGTGCAAAATGAGAAGAAGAGGCACAGG	190
2024cnts	HIV+ Asymp.	AAAAAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCTCATTITCCATACAGTCAGTATCAATTCGTGGAAGAATTTCCAGACATTAAGATAGTCATCTTGGGGGCTGGTCTGCCGCTGCTTGTTCATGGTCATCTGCTACTCGGGAATCCTAAAAACTCTGCTTCGGTGTGCAAAATGAGAAGAAGAGGCACAGG	187
2026cnts	HIV+ Asymp.	CAAAAAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCTCATTITCCATACAGTCAGTATCAATTCGTGGAAGAATTTCCAGACATTAAGATAGTCATCTTGGGGGCTGGTCTGCCGCTGCTTGTTCATGGTCATCTGCTACTCGGGAATCCTAAAAACTCTGCTTCGGTGTGCAAAATGAGAAGAAGAGGCACAGG	190
2029cnts	HIV+ Asymp.	CAAAAAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCTCATTITCCATACAGTCAGTATCAATTCGTGGAAGAATTTCCAGACATTAAGATAGTCATCTTGGGGGCTGGTCTGCCGCTGCTTGTTCATGGTCATCTGCTACTCGGGAATCCTAAAAACTCTGCTTCGGTGTGCAAAATGAGAAGAAGAGGCACAGG	190
2036cnts	HIV+ Asymp.	ACAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCTCATTITCCATACAGTCAGTATCAATTCGTGGAAGAATTTCCAGACATTAAGATAGTCATCTTGGGGGCTGGTCTGCCGCTGCTTGTTCATGGTCATCTGCTACTCGGGAATCCTAAAAACTCTGCTTCGGTGTGCAAAATGAGAAGAAGAGGCACAGG	187
40hpg	HIV+ SIDA	CAAAAAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCTCATTITCCATACAGTCAGTATCAATTCGTGGAAGAATTTCCAGACATTAAGATAGTCATCTTGGGGGCTGGTCTGCCGCTGCTTGTTCATGGTCATCTGCTACTCGGGAATCCTAAAAACTCTGCTTCGGTGTGCAAAATGAGAAGAAGAGGCACAGG	190
44hpg	HIV+ SIDA	AAAAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCTCATTITCCATACAGTCAGTATCAATTCGTGGAAGAATTTCCAGACATTAAGATAGTCATCTTGGGGGCTGGTCTGCCGCTGCTTGTTCATGGTCATCTGCTACTCGGGAATCCTAAAAACTCTGCTTCGGTGTGCAAAATGAGAAGAAGAGGCACAGG	187
152hpg	HIV+ SIDA	GAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCTCATTITCCATACAGTCAGTACTCAAGTTCGTGGAAGAATTTCCAGACATTAAGATAGTCATCTTGGGGGCTGGTCTGCCGCTGCTTGTTCATGGTCATCTGCTACTCGGGAATCCTAAAAACTCTGCTTCGGTGTGCAAAATGAGAAGAAGAGGCACAGG	186
154hpg	HIV+ SIDA	AAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCTCATTITCCATACAGTCAGTATCAATTCGTGGAAGAATTTCCAGACATTAAGATAGTCATCTTGGGGGCTGGTCTGCCGCTGCTTGTTCATGGTCATCTGCTACTCGGGAATCCTAAAAACTCTGCTTCGGTGTGCAAAATGAGAAGAAGAGGCACAGG	182

HIV- exp : séronégatifs exposés au VIH-1/HIV+ Asymp : séropositifs asymptomatiques pour le VIH-1/
HIV+ SIDA : séropositifs malades du SIDA

4.2.2 Analyse des séquences :

➤ Recherche de similarité :

La confrontation de nos séquences aux banques de données internationales à l'aide du programme NCBI BLAST version N 2.2.13 a montré que les 12 séquences obtenues partagent de fortes homologues avec des séquences de CCR5 homozygote sauvage (Absence de la mutation $\Delta 32$). Les 50 séquences de référence ayant données les similarités les plus significatives sont énumérées en annexe 3. Les taux de similarité variant de 96 à 100% sont résumés dans le tableau XIII.

TABLEAU XIII: Homologie des séquences CCR5 Bko avec les bases de données NCBI

Séquence	Base de données	Score (bits)	Homologie/50 séquences de référence
136hgt	GenBank+EMBL+DDJB+PDB	325	97%
138hgt	GenBank+EMBL+DDJB+PDB	363	100%
106hgt	GenBank+EMBL+DDJB+PDB	369	99%
162hgt	GenBank+EMBL+DDJB+PDB	367	100%
2024cnts	GenBank+EMBL+DDJB+PDB	327	98%
2026cnts	GenBank+EMBL+DDJB+PDB	323	97%
2029cnts	GenBank+EMBL+DDJB+PDB	345	98%
2036cnts	GenBank+EMBL+DDJB+PDB	297	96%
40hpg	GenBank+EMBL+DDJB+PDB	347	99%
44hpg	GenBank+EMBL+DDJB+PDB	371	100%
152hpg	GenBank+EMBL+DDJB+PDB	278	97%
154hpg	GenBank+EMBL+DDJB+PDB	339	98%

Le score est un paramètre bioinformatique permettant d'apprécier la qualité d'un alignement. Avec le programme NCBI BLAST un score supérieur à 200 atteste d'une qualité élevée. Toutes les séquences obtenues partagent de fortes homologues avec des séquences de références CCR5 homozygotes sauvages.

➤ **Alignement Multiple des séquences :**

Le programme d'alignement multiple CLUSTAL W version 1.83 fut utilisé pour l'analyse comparée des séquences obtenues. La portion la plus conservée dans les séquences de référence a été prise comme base de comparaison. Cette portion est identifiée par <<SeqRef>> dans tous les alignements. Le codage nucléotidique est A pour adénine, T pour Thymines, C pour cytosine et G pour guanine. Les résultats suivants ont été obtenus :

- Séquences CCR5 hpg (Malades du SIDA) :

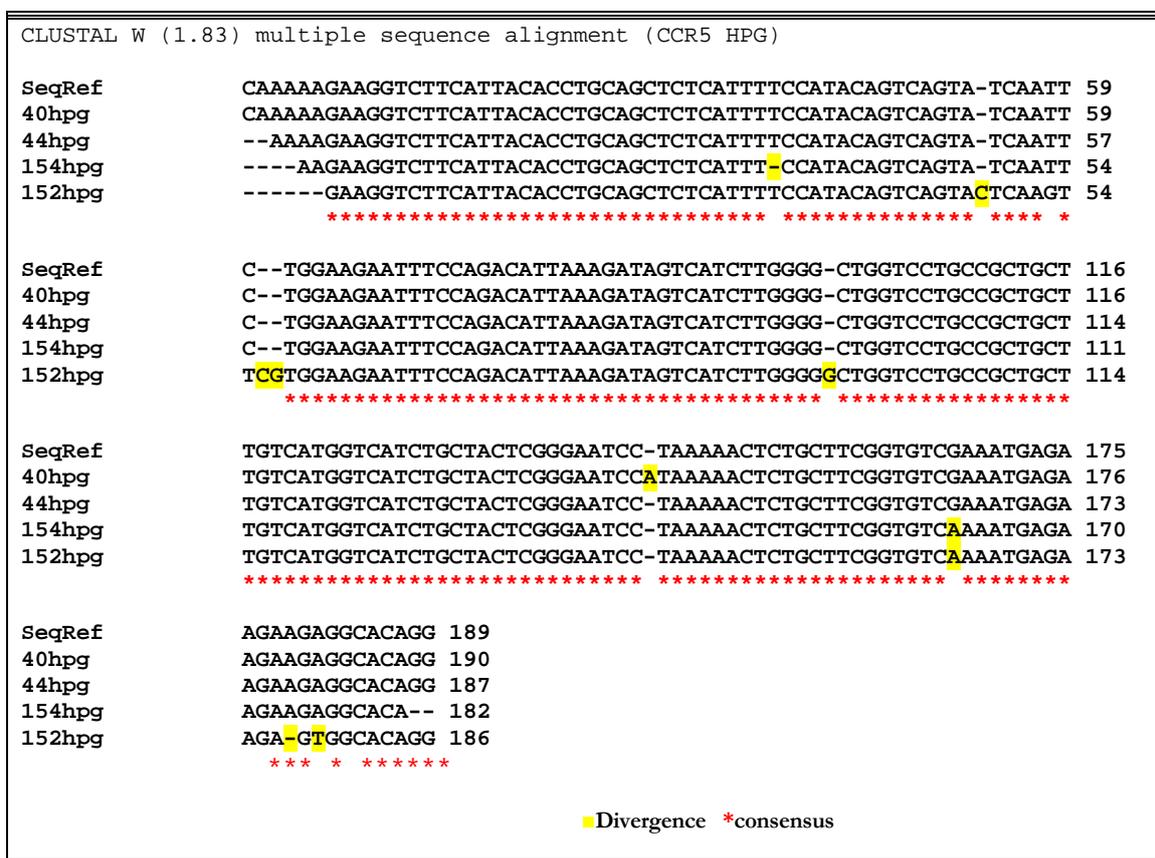


Figure 15: Alignement multiple des séquences CCR5hpg (Malades du SIDA).

Les séquences CCR5 de malades du SIDA montrent une forte homologie avec la séquence de référence. Cependant quelques divergences ponctuelles sont observées :

- Une insertion de A à la position 146 pour l'échantillon 40hpg.
- Une homologie parfaite avec la séquence de référence pour l'échantillon 44hpg
- Une délétion d'une thymine (T) à la position 39 et une substitution de A par G à la position 67 pour l'échantillon 154hpg.
- Pour l'échantillon 152 nous avons les insertions de C à la position 54 et de G à la position 99 ; une insertion bi nucléotidique CG à la position 61 ; les substitutions G/A à la position 67 et A/T à la position 181 et une délétion de A à la position 79.

L'alignement deux à deux des séquences de sujets VIH+ malades du SIDA et la séquence de référence donne des homologies comprises entre 96 et 100% (**Tab. XIV**).

TABLEAU XIV: Homologies des séquences CCR5 hpg (Malades du SIDA)

[]=====SEQUENCE A =====[]=====SEQUENCE B=====						
NoA	Seq A	Pb	NoB	SeqB	Pb	Score (%)
=====						
1	SeqRef	189	2	40hpg	190	100
1	SeqRef	189	3	44hpg	187	100
1	SeqRef	189	4	152hpg	186	96
1	SeqRef	189	5	154hpg	182	99
2	40hpg	190	3	44hpg	187	100
2	40hpg	190	4	152hpg	186	96
2	40hpg	190	5	154hpg	182	99
3	44hpg	187	4	152hpg	186	96
3	44hpg	187	5	154hpg	182	99
4	152hpg	186	5	154hpg	182	97
=====						

NoA : Numéro d'ordre de la séquence A dans l'alignement multiple

NoB : Numéro d'ordre de la séquence B dans l'alignement multiple

Seq A / Seq B : séquence A / Sequence B

Pb = Taille de la séquence en paire de bases.

Score : Homologie entre les deux séquences (en pourcentage)

Séquences CCR5 cnts (Séropositifs asymptomatiques) :

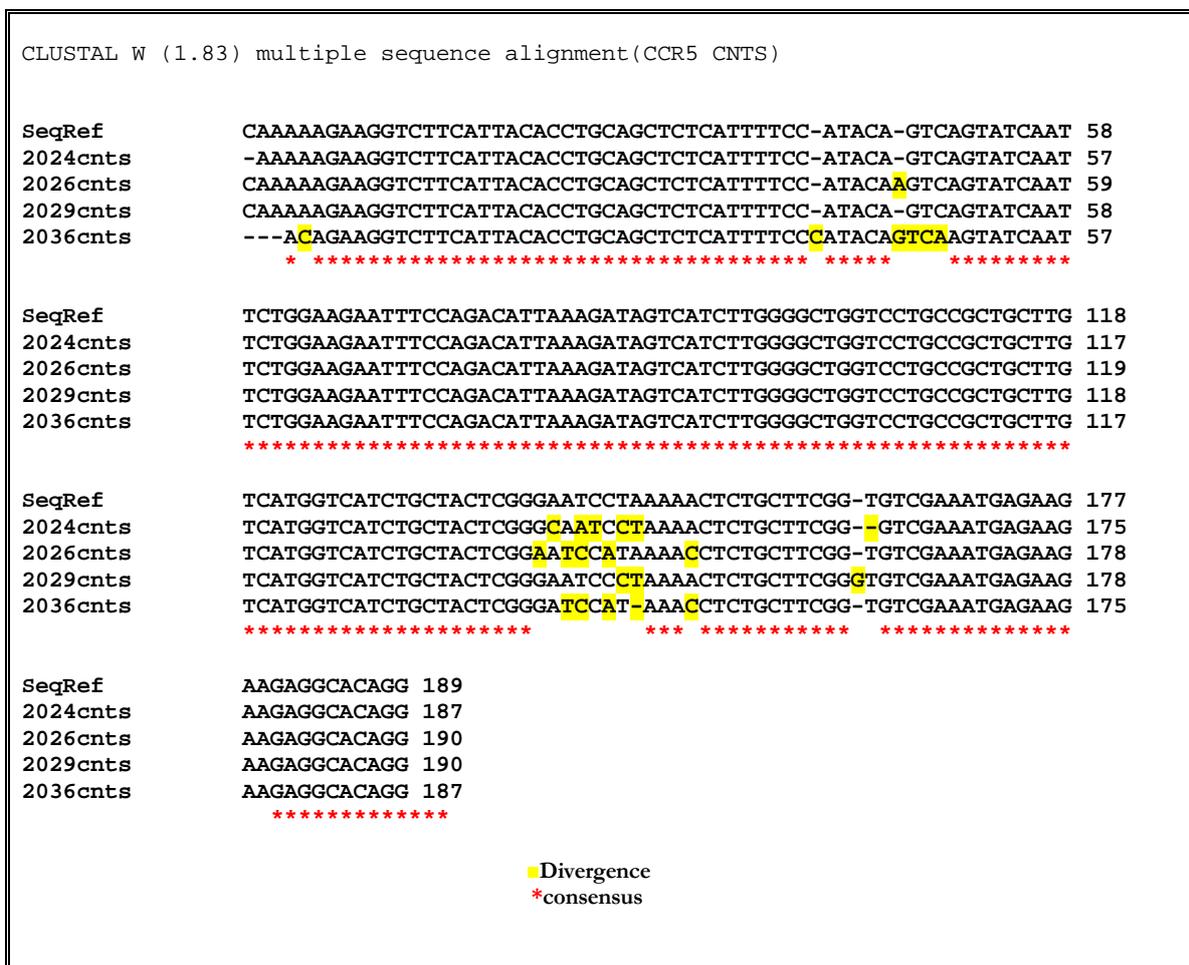


Figure 16 : Aligement multiple des séquences CCR5cnts (Séropositifs asymptomatiques)

Les séquences CCR5 de sujets VIH+ asymptomatiques montre deux zones de micro hétérogénéité par rapport à la séquence de référence, situées respectivement de la position 39 à la position 50 et de 139 à 152.

L'alignement deux à deux des séquences de sujets VIH+ asymptomatiques et la séquence de référence donne des homologies comprises entre 96 et 99% (Tab.XV)

TABLEAU XV: Homologies des séquences CCR5cnts

NoA	Seq A	Pb	NoB	SeqB	Pb	Score(%)
1	SeqRef	189	2	2024cnts	187	99
1	SeqRef	189	3	2026cnts	190	97
1	SeqRef	189	4	2029cnts	190	98
1	SeqRef	189	5	2036cnts	187	96
2	2024cnts	187	3	2026cnts	190	98
2	2024cnts	187	4	2029cnts	190	98
2	2024cnts	187	5	2036cnts	187	96
3	2026cnts	190	4	2029cnts	190	98
3	2026cnts	190	5	2036cnts	187	96
4	2029cnts	190	5	2036cnts	187	97

NoA : Numéro d'ordre de la séquence A dans l'alignement multiple

NoB : Numéro d'ordre de la séquence B dans l'alignement multiple

Seq A / Seq B : séquence A / Séquence B

Pb = Taille de la séquence en paire de bases.

Score : Homologie entre les deux séquences (en pourcentage)

-Séquences CCR5 hgt (Séronégatifs exposés) :

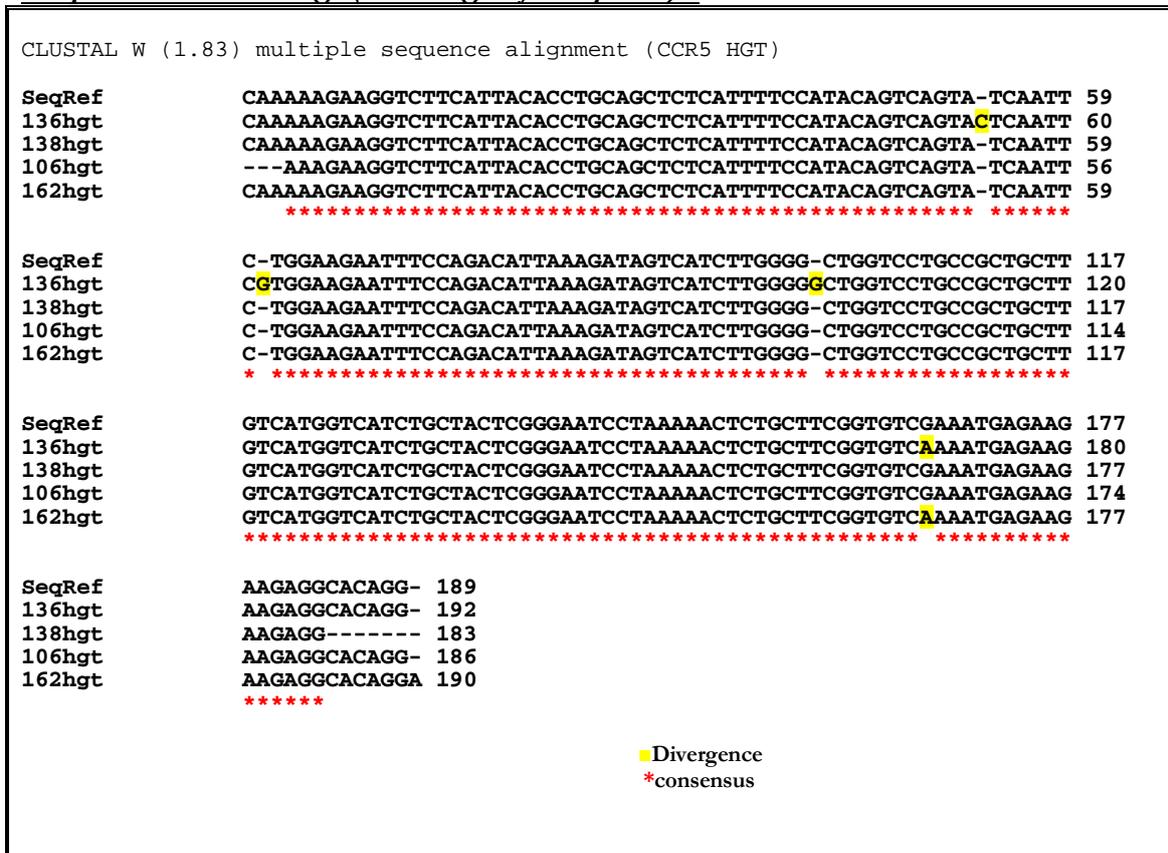


Figure17 : Alignement multiple des séquences CCR5hgt (séronégatifs)

Les séquences CCR5 de séronégatifs exposés au SIDA présentent une grande homologie avec la séquence de référence.

La séquence 162hgt présente une seule divergence, une substitution G/A à la position 167 quelle partage avec la séquence 136hgt.

La séquence 136hgt est la plus divergente avec trois insertions de C, G et G respectivement aux positions 53, 61 et 99, en plus de la substitution décrite plus haut.

L'alignement deux à deux des séquences de sujets séronégatifs et la séquence de référence donne des homologies comprises 99 et 100% (**Tab.XVI**).

TABLEAU XVI: Homologies des séquences CCR5 hgt (Séronégatifs exposés)

[]=====SEQUENCE A =====[]=====SEQUENCE B=====						
NoA	Seq A	Pb	NoB	SeqB	Pb	Score (%)
=====						
1	SeqRef	189	2	136hgt	192	99
1	SeqRef	189	3	138hgt	183	100
1	SeqRef	189	4	106hgt	186	100
1	SeqRef	189	5	162hgt	190	99
2	136hgt	192	3	138hgt	183	99
2	136hgt	192	4	106hgt	186	99
2	136hgt	192	5	162hgt	190	99
3	138hgt	183	4	106hgt	186	98
3	138hgt	183	5	162hgt	190	99
4	106hgt	186	5	162hgt	190	99

NoA : Numéro d'ordre de la séquence A dans l'alignement multiple

NoB : Numéro d'ordre de la séquence B dans l'alignement multiple

Seq A / Seq B : séquence A / Sequence B

Pb = Taille de la séquence en paire de bases.

Score : Homologie entre les deux séquences (en pourcentage)

- Séquences CCR5 Bko(hpg + cnts + hgt) :

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment (CCR5 BKO)		
SeqRef	CAAAAAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCTCATTTT-CCATACA-GTCAGTA-TCAA	57
136hgt	CAAAAAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCTCATTTT-CCATACA-GTCAGTACTCAA	58
138hgt	CAAAAAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCTCATTTT-CCATACA-GTCAGTA-TCAA	57
106hgt	---AAAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCTCATTTT-CCATACA-GTCAGTA-TCAA	54
162hgt	CAAAAAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCTCATTTT-CCATACA-GTCAGTA-TCAA	57
2024cnts	-AAAAAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCTCATTTT-CCATACA-GTCAGTA-TCAA	56
2026cnts	CAAAAAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCTCATTTT-CCATACAAGTCAGTA-TCAA	58
2029cnts	CAAAAAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCTCATTTT-CCATACA-GTCAGTA-TCAA	57
2036cnts	---ACAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCTCATTTTCCATACA-GTCAAGTATCAA	56
40hpg	CAAAAAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCTCATTTT-CCATACA-GTCAGTA-TCAA	57
44hpg	-AAAAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCTCATTTT-CCATACA-GTCAGTA-TCAA	55
152hpg	-----GAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCTCATTTT-CCATACA-GTCAGTA	52
154hpg	----AAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCTCATTT-CCATACA-GTCAGTA-TCAA	52

SeqRef	--TTCTGGAAGAATTTCCAGACATTAAGATAGTCATCTTGGGG-CTGGTCTGCCGCTG	114
136hgt	-TTCGGAAGAATTTCCAGACATTAAGATAGTCATCTTGGGGCTGGTCTGCCGCTG	117
138hgt	--TTCTGGAAGAATTTCCAGACATTAAGATAGTCATCTTGGGG-CTGGTCTGCCGCTG	114
106hgt	--TTCTGGAAGAATTTCCAGACATTAAGATAGTCATCTTGGGG-CTGGTCTGCCGCTG	111
162hgt	--TTCTGGAAGAATTTCCAGACATTAAGATAGTCATCTTGGGG-CTGGTCTGCCGCTG	114
2024cnts	--TTCTGGAAGAATTTCCAGACATTAAGATAGTCATCTTGGGG-CTGGTCTGCCGCTG	113
2026cnts	--TTCTGGAAGAATTTCCAGACATTAAGATAGTCATCTTGGGG-CTGGTCTGCCGCTG	115
2029cnts	--TTCTGGAAGAATTTCCAGACATTAAGATAGTCATCTTGGGG-CTGGTCTGCCGCTG	114
2036cnts	--TTCTGGAAGAATTTCCAGACATTAAGATAGTCATCTTGGGG-CTGGTCTGCCGCTG	113
40hpg	--TTCTGGAAGAATTTCCAGACATTAAGATAGTCATCTTGGGG-CTGGTCTGCCGCTG	114
44hpg	--TTCTGGAAGAATTTCCAGACATTAAGATAGTCATCTTGGGG-CTGGTCTGCCGCTG	112
152hpg	GTTCTGGAAGAATTTCCAGACATTAAGATAGTCATCTTGGGGCTGGTCTGCCGCTG	112
154hpg	--TTCTGGAAGAATTTCCAGACATTAAGATAGTCATCTTGGGG-CTGGTCTGCCGCTG	109
	* *****	
SeqRef	CTTGTTCATGGTCATCTGCTACTCGGGAATCC-TAAAACTCTGCTTCGG-TGTCGAAATG	172
136hgt	CTTGTTCATGGTCATCTGCTACTCGGGAATCC-TAAAACTCTGCTTCGG-TGTCGAAATG	175
138hgt	CTTGTTCATGGTCATCTGCTACTCGGGAATCC-TAAAACTCTGCTTCGG-TGTCGAAATG	172
106hgt	CTTGTTCATGGTCATCTGCTACTCGGGAATCC-TAAAACTCTGCTTCGG-TGTCGAAATG	169
162hgt	CTTGTTCATGGTCATCTGCTACTCGGGAATCC-TAAAACTCTGCTTCGG-TGTCGAAATG	172
2024cnts	CTTGTTCATGGTCATCTGCTACTCGGGCAATCTAAAACTCTGCTTCGG-GTCGAAATG	170
2026cnts	CTTGTTCATGGTCATCTGCTACTCGGGAATCCAAATCCATAAAACTCTGCTTCGG-TGTCGAAATG	173
2029cnts	CTTGTTCATGGTCATCTGCTACTCGGGAATCCCTAAAACTCTGCTTCGG-TGTCGAAATG	173
2036cnts	CTTGTTCATGGTCATCTGCTACTCGGGATCCATAAACCTCTGCTTCGG-TGTCGAAATG	170
40hpg	CTTGTTCATGGTCATCTGCTACTCGGGAATCCATAAAACTCTGCTTCGG-TGTCGAAATG	173
44hpg	CTTGTTCATGGTCATCTGCTACTCGGGAATCC-TAAAACTCTGCTTCGG-TGTCGAAATG	170
152hpg	CTTGTTCATGGTCATCTGCTACTCGGGAATCC-TAAAACTCTGCTTCGG-TGTCGAAATG	170
154hpg	CTTGTTCATGGTCATCTGCTACTCGGGAATCC-TAAAACTCTGCTTCGG-TGTCGAAATG	167

SeqRef	AGAAGAAGAGGCACAGG- 189	
136hgt	AGAAGAAGAGGCACAGG- 192	
138hgt	AGAAGAAGAGG----- 183	
106hgt	AGAAGAAGAGGCACAGG- 186	
162hgt	AGAAGAAGAGGCACAGGA 190	
2024cnts	AGAAGAAGAGGCACAGG- 187	
2026cnts	AGAAGAAGAGGCACAGG- 190	
2029cnts	AGAAGAAGAGGCACAGG- 190	
2036cnts	AGAAGAAGAGGCACAGG- 187	
40hpg	AGAAGAAGAGGCACAGG- 190	
44hpg	AGAAGAAGAGGCACAGG- 187	
152hpg	AGAAGAAGAGGCACAGG- 186	
154hpg	AGAAGAAGAGGCACACA--- 182	

Figure 18 : Alignement multiple global des séquences CCR5 Bamako

L'alignement multiple des trois groupes de séquences montre une vision globale des divergences décrites précédemment. Pour chacune des populations. Néanmoins l'alignement deux à deux des séquences des tous les trois groupes de sujets (malades, séropositifs asymptomatiques et séronégatifs) a donné des homologies allant de 93 à 100% (**Tab.XXIII**).

TABLEAU XVII: Scores de l'alignement des séquences CCR5 BAMAKO

[]=====SEQUENCE A =====[]=====SEQUENCE B=====						
NoA	Seq A	Pb	NoB	SeqB	Pb	Score(%)
1	SeqRef	189	2	136hgt	192	99
1	SeqRef	189	3	138hgt	183	100
1	SeqRef	189	4	106hgt	186	100
1	SeqRef	189	5	162hgt	190	99
1	SeqRef	189	6	2024cnts	187	99
1	SeqRef	189	7	2026cnts	190	97
1	SeqRef	189	8	2029cnts	190	98
1	SeqRef	189	9	2036cnts	187	96
1	SeqRef	189	10	40hpg	190	100
1	SeqRef	189	11	44hpg	187	100
1	SeqRef	189	12	152hpg	186	96
1	SeqRef	189	13	154hpg	182	99
2	136hgt	192	3	138hgt	183	99
2	136hgt	192	4	106hgt	186	99
2	136hgt	192	5	162hgt	190	99
2	136hgt	192	6	2024cnts	187	98
2	136hgt	192	7	2026cnts	190	96
2	136hgt	192	8	2029cnts	190	97
2	136hgt	192	9	2036cnts	187	94
2	136hgt	192	10	40hpg	190	98
2	136hgt	192	11	44hpg	187	99
2	136hgt	192	12	152hpg	186	98
2	136hgt	192	13	154hpg	182	100
3	138hgt	183	4	106hgt	186	98
3	138hgt	183	5	162hgt	190	99
3	138hgt	183	6	2024cnts	187	98
3	138hgt	183	7	2026cnts	190	97
3	138hgt	183	8	2029cnts	190	98
3	138hgt	183	9	2036cnts	187	95
3	138hgt	183	10	40hpg	190	100
3	138hgt	183	11	44hpg	187	98
3	138hgt	183	12	152hpg	186	93
3	138hgt	183	13	154hpg	182	97
4	106hgt	186	5	162hgt	190	99
4	106hgt	186	6	2024cnts	187	98
4	106hgt	186	7	2026cnts	190	97

4	106hgt	186	8	2029cnts	190	98
4	106hgt	186	9	2036cnts	187	97
4	106hgt	186	10	40hpg	190	100

||=====SEQUENCE A =====||=====SEQUENCE B=====||

NoA	Seq A	Pb	NoB	SeqB	Pb	Score (%)
4	106hgt	186	11	44hpg	187	100
4	106hgt	186	12	152hpg	186	96
4	106hgt	186	13	154hpg	182	99
5	162hgt	190	6	2024cnts	187	98
5	162hgt	190	7	2026cnts	190	96
5	162hgt	190	8	2029cnts	190	97
5	162hgt	190	9	2036cnts	187	96
5	162hgt	190	10	40hpg	190	98
5	162hgt	190	11	44hpg	187	99
5	162hgt	190	12	152hpg	186	97
5	162hgt	190	13	154hpg	182	100
6	2024cnts	187	7	2026cnts	190	98
6	2024cnts	187	8	2029cnts	190	98
6	2024cnts	187	9	2036cnts	187	96
6	2024cnts	187	10	40hpg	190	98
6	2024cnts	187	11	44hpg	187	98
6	2024cnts	187	12	152hpg	186	95
6	2024cnts	187	13	154hpg	182	98
7	2026cnts	190	8	2029cnts	190	98
7	2026cnts	190	9	2036cnts	187	96
7	2026cnts	190	10	40hpg	190	98
7	2026cnts	190	11	44hpg	187	97
7	2026cnts	190	12	152hpg	186	94
7	2026cnts	190	13	154hpg	182	96
8	2029cnts	190	9	2036cnts	187	97
8	2029cnts	190	10	40hpg	190	98
8	2029cnts	190	11	44hpg	187	98
8	2029cnts	190	12	152hpg	186	95
8	2029cnts	190	13	154hpg	182	98
9	2036cnts	187	10	40hpg	190	97
9	2036cnts	187	11	44hpg	187	96
9	2036cnts	187	12	152hpg	186	93
9	2036cnts	187	13	154hpg	182	96
10	40hpg	190	11	44hpg	187	100
10	40hpg	190	12	152hpg	186	96
10	40hpg	190	13	154hpg	182	99
11	44hpg	187	12	152hpg	186	96
11	44hpg	187	13	154hpg	182	99
12	152hpg	186	13	154hpg	182	97

NoA : Numéro d'ordre de la séquence A dans l'alignement multiple

NoB : Numéro d'ordre de la séquence B dans l'alignement multiple

Seq A / Seq B : séquence A / Sequence B

Pb = Taille de la séquence en paire de bases.

Score : Homologie entre les deux séquences (en pourcentage)

➤ **Analyses phylogénétiques :**

Les relations évolutives de nos séquences entre elles et par rapport à la séquence de référence ont été établies par réalisation d'arbres phylogénétiques à partir des alignements multiples (CLustal W 1.83.) Précédemment évoqués.

Les arbres phylogénétiques ont été réalisés pour chaque groupe de séquences d'une part et pour toutes les séquences ensemble quelque soit le groupe d'autre part.

Malades du SIDA:



Figure 19 : Phylogramme des séquences CCR5hpg

Analyse phylogénétique des séquences CCR5 obtenues de sujets malades du SIDA. Les séquences ont été alignées avec une séquence de référence homozygote non mutée. L'arbre a été construit selon la méthode PHYLIP de Felsenstein..

Les séquences 40hpg et 44hpg sont très similaires de la séquence de référence. L'aspect très distant de la séquence 152hpg fait penser à une hypermutation pseudogène. Les séquences 154hpg et 152hpg sont portées par la même branche qui elle-même rejoint les autres séquences.

Séropositifs asymptomatiques :



Figure 20 : Phylogramme des séquences CCR5cnts

Analyse phylogénétique des séquences CCR5 obtenues de sujets séropositifs et asymptomatiques. Les séquences ont été alignées avec une séquence de référence homozygote non mutée. L'arbre a été construit selon la méthode PHYLIP de Felsenstein.

Toutes les séquences sont rattachables à un ancêtre commun. Les séquences 2024cnts et 2029cnts sont très proches en terme de distances génétique ; De même que les séquence 2026cnts et SeqRef. Néanmoins la séquence 2024cnts forme un clade avec la séquence de référence SeqRef. Ces deux séquences prises ensembles forment un autre clade avec la séquence 2026 qui exclut 2029. Ce qui laisse présager que ces trois séquences (2024,2026 et seqRef) pourraient aboutir à des fonctions biologiques communes.

La séquences 2036 est la plus divergente car ayant la distance génétique la plus longue.

Séronégatifs exposés :



Figure : Phylogramme des séquences CCR5hgt

Analyse phylogénétique des séquences CCR5 obtenues de sujets séronégatifs exposés. Les séquences ont été alignées avec une séquence de référence homozygote non mutée. L'arbre a été construit selon la méthode PHYLIP de Felsenstein.

Les séquences 136 et 162 sont très proches. Alors que la séquence 106 se rapproche de la séquence de référence. La séquence 138, bien que divergente des autres en terme de distance, forme un clade avec la séquence de référence.

Séquences CCR5 Bko(hpg+cnts+hgt) :

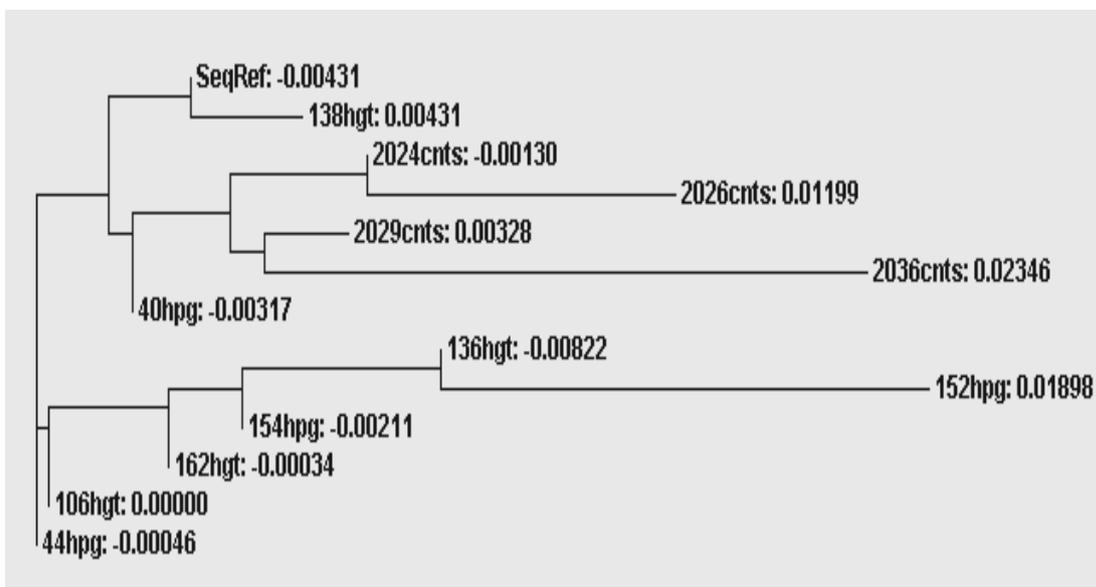


Figure 21 : Phylogramme des séquences CCR5 Bamako

Analyse phylogénétique de toutes les séquences CCR5 obtenues dans les trois groupes de populations. Les séquences ont été alignées avec une séquence de référence homozygote non mutée. L'arbre a été construit selon la méthode PHYLIP de Feldenstein

Les séquences 44hpg, 106hgt, 40hpg, 162hgt, 154hpg, 138hgt et la séquence de référence sont très proches en distance génétique. Il est important de remarquer que les séquences **cnts** forment un groupe distinct sur la même branche alors que les séquences Hpg et hgt se répartissent de part et d'autre de l'arbre.

Cependant les séquences sont dans l'ensemble rattachables à un ancêtre commun.

DISCUSSION

5. DISCUSSION

Notre étude avait pour but d'explorer le polymorphisme génétique de CCR5, récepteur de chimiokines et corécepteur majeur du VIH-1. L'allèle delta 32 du gène codant pour ce récepteur, résultant d'une délétion de 32 paires de bases par rapport à l'allèle normal est significativement impliqué dans les phénomènes de résistance absolue à l'infection par des souches virales de tropisme macrophagique (R5) responsable de plus de 90% des primo infections **(1,8)**.

Nous avons donc effectué le génotypage de cet allèle d'une part et évaluer le polymorphisme nucléotidique d'une portion du gène *CCR5* contenant le site de la mutation d'autre part.

La PCR utile pour l'analyse des polymorphismes de taille, reste toutefois limitée pour l'exploration des micros hétérogénéités de taille et de séquence. Nous avons de ce fait rajouté le séquençage et les outils bioinformatique d'analyse de séquences d'ADN à notre démarche méthodologique afin de mieux apprécier la diversité génétique du gène de CCR5 dont le rôle essentiel dans l'attachement du virus aux cellules de l'hôte est désormais acquis. **(4,8)**.

Notre population d'étude était constituée de trois groupes de sujets selon le statut VIH/SIDA ; à savoir des malades du SIDA, des séropositifs asymptomatiques et des séronégatifs à risque (exposés au virus). Le choix de ces groupes se justifie par le fait que n'ayant à pas notre disposition une cohorte épidémiologique de l'infection à VIH dans laquelle les types de progression de la maladie seraient clairement identifiés et suivis, nous avons opté pour des groupes extrême de l'infection du moins au moment des prélèvements.

Le génotypage de l'allèle *CCR5Δ32* a été fait par la PCR avec des marqueurs moléculaires qui de part leur « design » sont à même de discriminer l'allèle normal

du muté par production d'un amplicon de PCR 189 pb ou de 157 pb selon que la mutation soit présente ou absente.

Tous les 230 échantillons d'ADN des trois groupes de sujets de l'étude ont pu être amplifiés par la PCR CCR5 ; soit 100 % de réponse positive ce qui montre la spécificité des marqueurs moléculaires utilisés.

A l'analyse des gels d'agarose, après électrophorèse des produits de PCR, avec le logiciel kodak EDAS 290 1D version 3.5.4, il ressort que tous les amplicons ont donné un fragment unique de taille comprise entre 187 pb et 192 pb avec une moyenne de 190 pb. La taille moyenne des amplicons très proche de 189 pb (taille de l'allèle normal non muté) et l'unicité du fragment nous ont permis d'affirmer que tous les échantillons de l'étude sont du génotype CCR5 homozygote sauvage. L'allèle muté n'a donc pas été détecté dans notre population d'étude.

Cette absence de la mutation delta 32 de CCR5 confirme de nombreuses études sur la rareté de ce polymorphisme chez les personnes d'origines africaine et asiatiques. En effet, Samson et al. en 1996 sur une population ouest africaine séronégative (n=124), Huang et al. en 1996 en Haïti chez des sujets de race noire (n=137), Zimmerman et al. en 1997 avec des sujets africain donneurs de sang (n=40) et Xiao et al. en 1999 en chine (n=1248) ont obtenues les mêmes résultats de génotypage de CCR5.

Cette rareté quasi exclusive de ce polymorphisme de résistance naturelle à l'infection par le VIH, pourrait en partie expliquer l'ampleur de la pandémie du SIDA sur le continent africain.

Aussi, compte tenu du fait que 90 % primo infection concerne les cellules [CD4⁺, CCR5⁺] exprimées majoritairement sur les muqueuses **(8)** et que la voie sexuelle constitue l'essentielle des contaminations en Afrique **(43)**, l'approche

thérapeutique par les antagonistes CCR5 et les inhibiteurs de fusion pourraient se révéler efficace pour freiner la pandémie (83).

- **Evaluation du polymorphisme nucléotidique :**

L'exploration du polymorphisme nucléotidique de CCR5 a été effectuée par le séquençage des amplicons de PCR selon la méthode automatique direct par électrophorèse de capillarité suivie de l'analyse bioinformatique des séquences obtenues.

Afin d'avoir une indication sur l'ampleur du polymorphisme nucléotidique de cette portion de CCR5, nous nous sommes proposé d'emblé de séquencer 5% environ des échantillons. Ainsi 12 séquences au total ont été obtenues soit 4 séquences pour chaque groupe de la population d'étude. La taille moyenne des séquences obtenues était de 188 pb (182 – 192 pb). L'analyse des séquences nucléotidiques a porté sur deux aspects, en premier lieu la confrontation de celles-ci avec les banques de données génomique afin de confirmer leur identité et leur génotype. En second lieu les divergences des séquences entre elles et par rapport aux séquences de références ont été identifiées.

Ainsi La recherche de similarité de nos séquences avec les banques de données à l'aide du logiciel en ligne NCBI BLAST N 2.13 a montré que nos séquences présentent de fortes homologies (96 à 100%) avec des séquences CCR5 portant l'allèle normal non mutée. Ce qui confirme les résultats de la PCR de génotypage. Ces fortes homologies montre encore une fois la spécificité des marqueurs utilisés pour le génotypage de CCR5.

Cependant le séquençage, en montrant que des divergences (1-4%) existent entre les séquences obtenues et par rapport aux bases de données génomiques, comble donc une des limites de la PCR qui ne permet que des analyse de taille.

Pour donc évaluer le polymorphisme nucléotidique des séquences CCR5 obtenues à BAMAKO nous avons utilisé la version 1.83 du programme d'alignement multiple CLUSTAL W. Il ressort des différents alignements que :

-Les séquences provenant de sujets malades du SIDA et de sujets séronégatifs partagent de fortes homologies entre elles et avec la séquence de référence (non mutée). Néanmoins quelques divergences nucléotidiques ponctuelles et disparates sur l'ensemble des séquences de ces deux groupes ont été constatées. Etant conscient de la possibilité d'erreurs de la taq polymérase lors de la PCR ou de la faiblesse de détection de la fluorescence émise par un nucléotide marqué au cour du séquençage, une collection de produits de plusieurs PCR différentes sur un même échantillon minimiserait sûrement leurs impacts. Les analyses phylogénétiques réalisées rapprochent aussi ces deux groupes de séquences (Malades et séronégatifs)

Quant aux séquences issues de sujets séropositifs asymptomatiques, malgré une homologie globale de 96 à 99%, une micro hétérogénéité est à signaler. Contrairement aux deux groupes précédents, les divergences observées sont localisée dans la même zone au niveau des quatre séquences surtout entre les nucléotides 139 et 152. L'état asymptomatique de ces sujets pourrait ouvrir la porte à des conjectures sur d'éventuels nouveaux polymorphismes de résistance ; mais il serait beaucoup plus prudent de mener des investigations préalables. Notamment en séquençant plusieurs amplicons de PCR de ces échantillons et surtout cloner ces amplicons et séquencer plusieurs clones. Ce n'est que la reproduction des mêmes divergences au niveau de plusieurs séquences clones qui

peut attester de la présence de mutations. Parallèlement au séquençage, suivre l'évolution de l'état asymptomatique de ces sujets.

La recherche et la caractérisation de mutations ne sont pas fortuites car une étude récente menée en Asie du sud-est a montré l'existence de mutations associées à des phénomènes de réduction fonctionnelle du corécepteur chez des sujets non porteur de l'allèle *CCR5* $\Delta 32$. **(18)**

Nos résultats sont donc indicatifs sur l'éventualité d'une zone polymorphe autour du site de la mutation delta 32. Il serait intéressant de poursuivre les investigations dans ce sens et même les étendre sur la totalité du gène.

Les corécepteurs sont le premier maillon essentiel à l'entrée du virus dans la cellule hôte. Le répertoire antigénique élevé du virus et sa grande diversité génétique ne semblent pas influencer sur l'utilisation des corécepteur. L'étude de leurs polymorphismes génétiques et de leurs interactions avec les protéines de l'enveloppe peut sans doute contribuer à une meilleure compréhension de la pathogènes de l'infection. De nouvelles approches thérapeutiques et vaccinale pouvant en découler

CONCLUSION
ET
RECOMMANDATIONS

CONCLUSION et RECOMMANDATIONS

Notre étude de type prospectif avait pour but d'étudier à Bamako le polymorphisme génétique de CCR5, corécepteur majeur du VIH-1.

La PCR et le séquençage automatique direct par capillarité furent respectivement utilisés pour le génotypage de l'allèle de résistance CCR5 Δ 32 et l'évaluation du polymorphisme nucléotidique. Il ressort de cette étude que :

-Tous les sujets de l'étude (100%) qu'il soient malades, séropositifs asymptomatiques ou séronégatifs exposés, sont porteur de l'allèle normal sans la délétion de 32 paires de bases. Ces sujets ont donc le génotype homozygote normal. Ce qui confirme la littérature scientifique sur l'absence de l'allèle de résistance naturelle (CCR5 Δ 32) chez les populations de race noire.

-Des séquences nucléotidique de CCR5 parfaitement exploitables ont été obtenues chez 12 sujets sélectionnés par tirage aléatoire sur les 230 de l'effectif total. Soit 5,21 %.

-Les séquences nucléotidiques de CCR5 obtenues à Bamako partagent de fortes homologues avec des séquences homozygotes sauvages issues des banques de données génomiques internationales. Les taux de similarités entant compris entre 96 et 100%.

-L'analyse des séquences d'ADN tout en confirmant le génotype a mis en évidence des divergences de 1 à 4% entre les échantillons. Les séquences des malades et celles des séronégatifs présentent de fortes homologues, malgré quelques mutations mono nucléotidiques isolées, alors que celles de sujets VIH+ asymptomatiques présentent toutes une même zone polymorphique de micro hétérogénéité nucléotidique. Cette zone est localisée entre les positions 139 et 152 de nos séquences.

Ces résultats qui confirment la rareté de la mutation de résistance CCR5 Δ 32 chez les populations africaines pourraient en partie expliquer l'ampleur de la pandémie du SIDA en Afrique noire.

L'évaluation du polymorphisme nucléotidique suggère aussi la présence probable d'autres mutations ponctuelles dans cette portion du gène CCR5. Il serait important de les caractériser et d'étudier leurs effets éventuels sur l'expression d'un récepteur fonctionnel et surtout sur l'évolution de l'infection chez ceux qui les portent.

Au terme de notre étude nous formulons les recommandations suivantes :

Au Laboratoire de Biologie Moléculaire appliquée (LBMA)

- Augmenter la taille de l'échantillonnage pour le séquençage.
- Continuer cette étude en rajoutant le clonage des amplicons de PCR à la démarche méthodologique.
- Suivre l'évolution de l'infection chez les sujets asymptomatiques présentant la zone polymorphique s'étendant de la base 139 à la base 152 de nos séquences.
- Entreprendre des études sur la totalité du gène *CCR5* en y associant les interactions conformationnelles avec la boucle *V3* du gène *Env* du VIH-1

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1) Stephen J. O'Brien, John P. Moore.
The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS.
Immunological Reviews 2000 Vol. 177: 99–111
- 2) Patrícia Munerato, Maria Lúcia Azevedo, et al.
Frequency of Polymorphisms of Genes Coding for HIV-1 Co-Receptors CCR5 and CCR2 in a Brazilian Population
The Brazilian Journal of Infectious Diseases 2003;7(4):236-240
- 3) Simon J.H., Somoza C., Schockmel G.A., et al.
Rat CD4 mutant containing the gp120-binding site mediates human immunodeficiency virus type 1 infection.
J. Exp. Med 1993;177:949-54.
- 4) Clapham P.R., Blanc D., Weiss R.A.
Specific cell surface requirements for the infection of CD4-positive cells by human immunodeficiency virus types 1 and 2 and by Simian immunodeficiency virus.
Virology 1991;181:703-15.
- 5) Horuk R.
Molecular properties of the chemokine receptor family.
Trends Pharmacol Sci 1994;15:159-65.
- 6) Schall T.J.
Biology of the RANTES/SIS cytokine family.
Cytokine 1991;3:165-8.
- 7) Samson M., Labbe O., Mollereau C., et al.
Molecular cloning and functional expression of a new human CC- chemokine receptor gene.
Biochemistry 1996;35:3362-7.
- 8) D'Souza M.P., Harden V.A.
Chemokines and HIV-1 second receptors. Confluence of two fields generates optimism in AIDS research.
Nat Med 1996;2:1293-300.
- 9) Koot M., Van't Wout A.B., Kootstra N.A., et al.
Relation between changes in cellular load, evolution of viral phenotype, and the clonal composition of virus populations in the course of human immunodeficiency virus type 1 infection.
J Infect Dis 1996;173:349-54 .

- 10)** Paxton W., Martin S.R., Tse D., et al.
Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high risk sexual exposure.
Nat Med 1996;2:412-7.
- 11)** Dean M., Carrington M., Winkler C., et al.
Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene.
Science 1996;27:273:1856-62.
- 12)** Liu R., Paxton W.A., Choe S., et al.
Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals.
Revista 1996.
- 13)** Rowland-Jones S., Sutton J., Ariyoshi K., et al.
HIV-specific cytotoxic T-cells in HIV-exposed but uninfected Gambian women.
Nat Med 1995;1:50-64.
- 14)** Wilkinson D.A., Operskalski E.A., Busch M.P., et al.
A32-bp deletion within the CCR5 locus protects against transmission of parenterally acquired human immunodeficiency virus but does not affect progression to AIDS-defining illness.
J Infect Dis 1998;178:1163-6.
- 15)** Zimmerman P.A., Buckler-White A., Alkhatib G., et al.
Inherited resistance to HIV-1 conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5; Studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk.
Mol. Med 1997;3:23-36.
- 16)** Smith M.W., Dean M., Carrington M., et al.
Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression.
Science 1997;15;277(5328):959-65
- 17)** Quillent C., Oberlin E., Braun J., et al.
HIV-1-resistance phenotype conferred by combination of two separate inherited mutations of CCR5 gene.
Lancet 1998;351:14-8.
- 18)** Capoulade-Metay C, Ma L, Truong LX, Dudoit Y, Versmisse P, Nguyen NV, Nguyen M, Scott-Algara D, Barre-Sinoussi F, Debre P, Bismuth G, Pancino G, Theodorou I
New CCR5 variants associated with reduced HIV coreceptor function in southeast Asia.
AIDS. 2004 Nov 19;18(17):2243-52.
PMID: 15577536 [PubMed - indexed for MEDLINE].

- 19) Center for diseases control (CDC)
task force on kaposi's sarcoma and opportunistic infections
Epidemiologic aspects of thr current outbreak of Kaposi's sarcoma and opportunistic infections.
N Engl j Med, 1982, 306: 248-252
- 20) Center for diseases control
Revision of the case definition of AIDS for national reporting.
United States MMWR 1985; 34: 373-375
- 21) OMS
Deuxième meeting des centres collaborateurs de l'OMS sur le SIDA. Bull.
OMS, 1986 ; 221-232
- 22) OMS
Syndrome d'Immunodeficiency Acquis, SIDA, revision 1987 de la definition CDC/OMS du cas de SIDA.
Ref Epidemio Hebdo 1988 ;63 :1-8
- 23) Fleury H J A.
Virologie humaine. 3^e edition Paris ; Masson 1999 . 205p
- 24) Center for diseases control
Classification for human t –lymphotropic Virus type III/Lyphadenopathy Associated Virus infection. Ann Int Med 1986 ; 105 : 234-237
- 25) Hoen B
Primo-infection par le VIH. In : Girard P.M, Katlama Ch, Pialoux G. SIDA. Doin; Paris 1998.p.67-71
- 26) Fonquernie L., Girard P.M
Classifications, définitions et facteurs prévisionnels d'évolution de l'infection VIH-1 chez l'adulte. In: Girard P.M, Katlama Ch, Pialoux G. VIH. Doin ; Paris 2004. p.53-63
- 27) ONUSIDA 2005
Le point sur l'épidémie de SIDA. Rapport spécial sur la prévention du VIH
Décembre 2005.
- 28) EDMS-III Enquête Démographique de Santé du Mali sur la prévalence du VIH 2003
- 29) nter for Disease Control.
eumocystis pneumonia – Los Angeles, *MMWR*.1981,30 :250-252.

- 30) Irko DG. Histoire du SIDA, 2^{ème} édition. Paris : Payet Paris. 1990, 392p.
- 31) Sonigo P, Alison M. Les virus VIH. *In* : L'objectif médical. Le SIDA, Edition Afrique noire francophone. Spécial et hors serie. Décembre 1989 : pp 6-20.
- 32) Essex M, McLane MF, Lee TH et al. Antibodies to cell membrane antigens associated with human T-cell leukaemia virus in patients with AIDS, *Science*. 1983 ; 220 : 85-868.
- 33) Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP et al. Isolation of human T-cell leukaemia- lymphoma virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS), *Science*. 1983 ; 220 : 865-868.
- 34) Barre-Sinoussi F, Cherman JC, Rey F et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk immune deficiency syndrome (AIDS), *Science* ; 1983, 220 : 868-871.
- 35) Gallo RC, Salhuddin 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.
- 36) Clavel F, Guetard D, Brun- Vezinet et al. Isolation of the new human retrovirus from West African patients with AIDS, *Science*. 1986; 223: 343-346.
- 37) Coffin J, Haase A, Levy JA et al. What to call the virus of AIDS, *Nature*. 1986 321:
- 38) Barry P. Wormser. AIDS and others manifestations of HIV infection, second edition : *Raven Press Ltd., New york* 1992. 71p.
- 39) Huraux J.M, Nicolas J.C, Agut H. *Virologie*. Flammarion ; Paris 1985
- 40) Sonigo P, Sonigo P. Les virus VIH. *In* : L'objectif médical. Le SIDA, Edition Afrique noire francophone. Spécial et hors serie. Décembre 1989 : pp 6-20.
- 41) Denis F, M'Bouop S, Sangaré A, Léonard G, Verdier M, Ranger S
Les virus de l'immunodéficience humaine. Structure, organisation génétique, replication. In : Pr marc Gentilini. SIDA Infection à VIH Aspects en zone tropicale. Ellipses ; Paris 1989.p.12-32
- 42) Barre-Sinoussi F
Virologie fondamentale de l'infection à VIH. In : Girard P.M, Katlama Ch, Pialoux G. SIDA. Doin ; Paris 1998.p.3-9
- 43) Jean Marie Huraux, Henri Agut, Jean Claude Nicolas et al. *Traité de virologie médicale*, Estem, 2003. 699p.
- 44) Klatzmann D
Immunologie et physiopathologie de l'infection par le VIH. In : Kernbaum S. Le praticien face au SIDA. Flammarion ; Paris 1992.p.8-13

- 45) Brun-Vezinet F, Wainberg M
HIV : Structure, multiplication et physiopathologie. In : Huraux J.M, Agut H, Nicolas J.C, Lafeuille H.P. *Traité de virologie médicale*. Edstein ; Paris 2003.p.319-329
- 46) Beatrice H, George M. Shaw, Kevin M. De Cock, Paul M. Sharp.
AIDS as a Zoonosis Scientific: Scientific and Public Health Implications, *Science* Vol. 287. 28 January 2000; 607-614.
- 47) Human retrovirus and AIDS 1998.
A compilation and Analysis Nucleid acid and amino acid sequence
(Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, 1988),
<http://hiv-web.lanl.gov>
- 48) F, Brun Vezinet, 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 :
- 49) McCutchan FE, Salminen MO, Carr JK et Burke DS.
HIV genetic diversity, *AIDS*. 1996; 10, S13-S20.
- 50) Peeters M, Gueye A, M'Bouop S et al.
Geographic distribution of HIV-1 group 0 in Africa. *AIDS*. 19997, 11: 493-498.
- 51) Simon F, Mauclore P, Roques P et al.
Identification of new human immunodeficiency virus type 1 distinct from M and group 0. *Nat Med*. 1998; 4; 1032-1037.
- 52) Keith A. Crandall, Daniel Vasco, David Posada and Hiromi Imamichi.
Advances in understanding the evolution of HIV, *AIDS*. 1999, 13 (suppl A) S1-S9.
- 53) Phyllis J Kandi.
Human Immunodeficiency virus type-2 (VIH-2). *AIDS review* 1999 ; 1 : 101-108.
- 54) Chen YM, lee CM, LIN RY, Chang HJ.
Molecular épidemiologie and trends of VIH-1 subtypes in Taiwan, *J Acaured Immune Defic Syndr Hum Retroviral*.1998 ; 19 : 393-402.
- 55) Liitsola K, Bobkov A et al.
An AB recombinant and its parentaral 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
- 56) 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; 51-8.

- 57) 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; 20(5); 522-30
- 58) Montavon C. Bilbollet- 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
- 59) Rosenheim M
Histoire naturelle de l'infection à VIH. In : Pr Gentilini. *SIDA Infection à VIH Aspects en zone tropicale*. Ellipses ; Paris 1989.p.80-91
- 60) Allain J.P. et coll.
Serologic markers in early stages of human immunodeficiency virus in hemophiliacs, *Lancet*. 1986; II: 1233-1236.
- 61) Bouchaud O, Fontanet A, Niyongabo T
Caractéristiques épidémiologiques et cliniques de l'infection VIH en région tropicale. In : Girard P.M, Katlama Ch, Pialoux G. *VIH. Doin*; Paris 2004.p.483-497
- 62) Kapita B
Aspects cliniques de l'infection à VIH de l'adulte en zone tropicale.
In : Pr Gentilini « Médecine tropicale » *SIDA Infection à VIH Aspects en Zone Tropicale*. Ellipses ; Paris 1989
- 63) [Pichard E.](#) [Doumbo O.](#) [Minta D.](#) [Traore HA.](#)
Role of cryptosporidiosis in diarrhea among hospitalized adults in Bamako. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*. 83:473-8, 1990.
- 64) Marc R, Itoua-N'gaporo A.
SIDA, infection à VIH aspects en zone tropicale Ellipse Paris/ AUPELF, 336p.
- 65) The Biology project, Immunology.
ELISA Activity: False positives; www.bology.Arizona.edu
- 66) Fry P. Wormser.
DS and others manifestations of HIV infection, second edition : *Raven Press Ltd, New York* 1992. 71p.
- 67) Descamps D, Perrin L, Vicent C
HIV Prise en charge du traitement. In : Huraux J.M, Agut H, Nicolas J.C, Lafeuille H.P. *Traité de virologie médicale*. Edsteim ; Paris 2003.p.345-357

- 68)** Katlama Ch, Pialoux G, Girard P.M
Thérapeutique antirétrovirale. In : Girard P.M, Katlama Ch, Pialoux G. SIDA.
Doin; Paris 1998.p.287-311
- 69)** Katlama Ch, Pialoux G, Girard P.M
Traitements antirétroviraux
. In : Katlama Ch, Girard P.M, Pialoux G. VIH. Doin; . Paris 2004 .Chap 25
- 70)** Jean-Paul Viard
(Service d'immunologie clinique, Hôpital Necker (Paris)
L'influence du terrain génétique sur l'évolution de l'infection VIH
TRANSCRIPTASE. Revue critique de l'actualité scientifique internationale sur le VIH et les
virus des hépatites
http://www.pistes.fr/transcriptases/75_1091
- 71)** Stéphanie Lavaud. Le journal du Sida.
Susceptibilité individuelle et résistance à l'infection
TRANSCRIPTASE. Revue critique de l'actualité scientifique internationale sur le VIH et les
virus des hépatites
http://www.pistes.fr/transcriptases/69_1036.htm
- 72)** Projet GRIV(génétique de la résistance face a l'infection par le VIH-1)
http://www.griv.org/index_fr.php?index=obj
- 73)** Choe, H., M. Farzan, Y. Sun, N. Sullivan, B. Rollins, P. D. Ponath, L. Wu, C. R. Mackay, G.
LaRosa, W. Newman, N. Gerard, C. Gerard and J. Sodroski (1996).
"The betachemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1
isolates." Cell 85(7): 1135-48.
- 74)** Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, S. Marmon,
R. E. Sutton, C. M. Hill, C. B. Davis, S. C. Peiper, T. J. Schall, D. R. Littman and N. R. Landau
(1996).
"Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1.
" Nature 381(6584): 661-6.
- 75)** Dragic, T., V. Litwin, G. P. Allaway, S. R. Martin, Y. Huang, K. A. Nagashima, C. Cayanan, P.J.
Maddon, R. A. Koup, J. P. Moore and W. A. Paxton (1996).
"HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5." Nature
381(6584): 667-73.
- 76)** Alkhatib, G., M. Locati, P. E. Kennedy, P. M. Murphy and E. A. Berger (1997).
"HIV-1 coreceptor activity of CCR5 and its inhibition by chemokines: independence from G
protein signaling and importance of coreceptor downmodulation."

Virology 234(2): 340-8

- 77)** Doranz, B. J., Z. H. Lu, J. Rucker, T. Y. Zhang, M. Sharron, Y. H. Cen, Z. X. Wang, H. H. Guo, J. G. Du, M. A. Accavitti, R. W. Doms and S. C. Peiper (1997b).
Two distinct CCR5 domains can mediate coreceptor usage by human immunodeficiency virus type 1.
J Virol 71(9): 6305-14.
- 78)** Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy and E. A. Berger (1996).
HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor.
Science 272(5263): 872-7
- 79)** Doranz, B. J., J. Rucker, Y. Yi, R. J. Smyth, M. Samson, S. C. Peiper, M. Parmentier, R. G. Collman and R. W. Doms (1996). "
A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors."
Cell 85(7): 1149-58.
- 80)** Farzan, M., H. Choe, K. A. Martin, Y. Sun, M. Sidelko, C. R. Mackay, N. P. Gerard, J. Sodroski and C. Gerard (1997).
"HIV-1 entry and macrophage inflammatory protein-1beta-mediated signaling are independent functions of the chemokine receptor CCR5."
J Biol Chem 272(11): 6854-7
- 81)** Horuk, R. (1998). "Chemokines beyond inflammation." Nature 393(6685): 524-5.
- 82)** Chanel, C., I. Staropoli, F. Baleux, A. Amara, A. Valenzuela-Fernandez, J. L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos and R. Altmeyer (2002).
"Low levels of co-receptor CCR5 are sufficient to permit HIV envelope-mediated fusion with resting CD4 T cells."
Aids 16(17): 2337-40.
- 83)** Valérie Klein(2005)
Contribution aux études structurales des récepteurs de chimiokines CCR5 et CXCR4, principaux co récepteurs du VIH-1 exprimés en système levure et en cellule d'insecte
THESE de Docteur de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg
Discipline : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie
Université Louis Pasteur – Strasbourg I Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé
- 84)** Maeda, Y., K. Yusa and S. Harada (2003).
"Enhanced infectivity of HIV-1 by X4 HIV-1 coinfection."
Biochem Biophys Res Commun 308(4): 906-13.

- 85)** Pollakis, G., S. Kang, A. Kliphuis, M. I. Chalaby, J. Goudsmit and W. A. Paxton (2001).
"NLinked
Glycosylation of the HIV Type-1 gp120 Envelope Glycoprotein as a Major
Determinant of CCR5 and CXCR4 Coreceptor Utilization."
J Biol Chem 276(16):
13433-41.
- 86)** Houshmand, P. and A. Zlotnik (2003).
"Therapeutic applications in the chemokine superfamily."
Curr Opin Chem Biol 7(4): 457-60.
- 87)** Onuffer, J. J. and R. Horuk (2002).
"Chemokines, chemokine receptors and smallmolecule antagonists: recent developments."
Trends Pharmacol Sci 23(10): 459-67.
- 88)** Srinivas Mummidi , Seema S. Ahuja , Brent L. McDaniel and Sunil K. Ahuja(1997)
The Human CC Chemokine Receptor 5 (CCR5) Gene.Multiple transcripts with 59-end
heterogeneity, dual promoter usage, and evidence for polymorphisms within the regulatory
regions and noncoding exons*
The journal of biological chemistry Vol. 272, No. 49, Issue of December 5, pp. 30662–30671,
1997
- 89)** Blanpain, C., F. Libert, G. Vassart and M. Parmentier (2002a).
"CCR5 and HIV infection."
Receptors Channels 8(1): 19-31.
- 90)** Mirzabekov, T., N. Bannert, M. Farzan, W. Hofmann, P. Kolchinsky, L. Wu, R. Wyatt and J.
Sodroski (1999).
"Enhanced expression, native purification, and characterization of CCR5, a principal HIV-1
coreceptor."
J Biol Chem 274(40):28745-50.
- 91)** Stenlund, P., G. J. Babcock, J. Sodroski and D. G. Myszka (2003).
"Capture and reconstitution of G protein-coupled receptors on a biosensor surface."
Anal Biochem 316(2): 243-50.
- 92)** Stephen J. O'Brien, John P. Moore.
Genetic map of chemokine receptor gene cluster on chromosome 3p21.
Immunological Reviews 2000Vol. 177:p 103
- 93)** Huang, Y., W. A. Paxton, S. M. Wolinsky, A. U. Neumann, L. Zhang, T. He, S. Kang, D.
Ceradini, Z. Jin, K. Yazdanbakhsh, K. Kunstman, D. Erickson, E. Dragon, N. R.
Landau, J. Phair, D. D. Ho and R. A. Koup (1996).
"The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression."
Nat Med 2(11): 1240-3.

- 94)** Rana, S., G. Besson, D. G. Cook, J. Rucker, R. J. Smyth, Y. Yi, J. D. Turner, H. H. Guo, J.G. Du, S. C. Peiper, E. Lavi, M. Samson, F. Libert, C. Liesnard, G. Vassart, R. W. Doms, M. Parmentier and R. G. Collman (1997).
"Role of CCR5 in infection of primary macrophages and lymphocytes by macrophage-tropic strains of human immunodeficiency virus: resistance to patient-derived and prototype isolates resulting from the delta ccr5 mutation."
J Virol 71(4): 3219-27.
- 95)** Benkirane, M., D. Y. Jin, R. F. Chun, R. A. Koup and K. T. Jeang (1997).
"Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32."
J Biol Chem 272(49): 30603-6.
- 96)** Lucotte, G. and F. Dieterlen (2003).
"More about the Viking hypothesis of origin of the delta32 mutation in the CCR5 gene conferring resistance to HIV-1 infection."
Infect Genet Evol 3(4): 293-5
- 97)** Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, et al.
Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene.
Nature 1996;382:722-5.
- 98)** Doranz BJ, Rucker J, Yi YJ, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, et al.
A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the β -chemokine receptors CKR-5, CKR-3 and CKR-2b as fusion cofactors.
Cell 1996;85:1149-58.
- 99)** Janet M. McNicholl, Dawn K. Smith, Shoukat H. Qari, and Thomas Hodge
Host Genes and HIV: The Role of the Chemokine Receptor Gene CCR5 and Its Allele (Δ 32 CCR5)
Emerging Infectious Diseases Vol. 3, No. 3, July–September 1997
- 100)** Blanpain, C., B. Lee, M. Tackoen, B. Puffer, A. Boom, F. Libert, M. Sharron, V. Wittamer, G. Vassart, R. W. Doms and M. Parmentier (2000).
"Multiple nonfunctional alleles of CCR5 are frequent in various human populations." Blood 96(5): 1638-45.
- 101)** Baba, M., O. Nishimura, N. Kanzaki, M. Okamoto, H. Sawada, Y. Iizawa, M. Shiraishi, Y. Aramaki, K. Okonogi, Y. Ogawa, K. Meguro and M. Fujino (1999).
"A small molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity."
Proc Natl Acad Sci U S A 96(10): 5698-703.
- 102)** Dragic, T., A. Trkola, D. A. Thompson, E. G. Cormier, F. A. Kajumo, E. Maxwell, S. W. Lin, W. Ying, S. O. Smith, T. P. Sakmar and J. P. Moore (2000).
"A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within the transmembrane

helices of CCR5.

" Proc Natl Acad Sci U S A 97(10): 5639-44

- 103)** Este, J. A. (2001).
"TAK-779 (Takeda)." *Curr Opin Investig Drugs* 2(3): 354-6.
- 104)** Takashima, K., H. Miyake, N. Kanzaki, Y. Tagawa, X. Wang, Y. Sugihara, Y. Iizawa and M. Baba (2005).
"Highly potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by TAK-220, an orally bioavailable small-molecule CCR5 antagonist."
Antimicrob Agents Chemother 49(8): 3474-82.
- 105)** Strizki, J. M., S. Xu, N. E. Wagner, L. Wojcik, J. Liu, Y. Hou, M. Endres, A. Palani, S. Shapiro, J. W. Clader, W. J. Greenlee, J. R. Tagat, S. McCombie, K. Cox, A. B. Fawzi, C. C. Chou, C. Pugliese-Sivo, L. Davies, M. E. Moreno, D. D. Ho, A. Trkola, C. A. Stoddart, J. P. Moore, G. R. Reyes and B. M. Baroudy (2001).
"SCH-C (SCH 351125), an orally bioavailable, small molecule antagonist of the chemokine receptor CCR5, is a potent inhibitor of HIV-1 infection in vitro and in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(22): 12718-23.
- 106)** Este, J. A. (2002). "Sch-351125 and Sch-350634. Schering-Plough." *Curr Opin Investig Drugs* 3(3): 379-83.
- 107)** Walker, D. K., S. Abel, P. Comby, G. J. Muirhead, A. N. Nedderman and D. A. Smith (2005).
"Species differences in the disposition of the CCR5 antagonist, UK-427,857, a new potential treatment for HIV."
Drug Metab Dispos 33(4): 587-95
- 108)** Nakata, H., K. Maeda, T. Miyakawa, S. Shibayama, M. Matsuo, Y. Takaoka, M. Ito, Y. Koyanagi and H. Mitsuya (2005).
"Potent anti-R5 human immunodeficiency virus type 1 effects of a CCR5 antagonist, AK602/ONO4128/GW873140, in a novel human peripheral blood mononuclear cell nonobese diabetic-SCID, interleukin-2 receptor gamma-chain-knocked-out AIDS mouse model."
J Virol 79(4): 2087-96.
- 109)** Singer, II, S. Scott, D. W. Kawka, J. Chin, B. L. Daugherty, J. A. DeMartino, J. DiSalvo, S. L. Gould, J. E. Lineberger, L. Malkowitz, M. D. Miller, L. Mitnaul, S. J. Siciliano, M. J. Staruch, H. R. Williams, H. J. Zweerink and M. S. Springer (2001).
"CCR5, CXCR4, and CD4 are clustered and closely apposed on microvilli of human macrophages and T cells."
J Virol 75(8): 3779-90

- 110)** Prinster, S. C., C. Hague and R. A. Hall (2005).
"Heterodimerization of g protein-coupled receptors: specificity and functional significance."
Pharmacol Rev 57(3): 289-98.
- 111)** Réseau GENET d'Enseignement en Génétique
Les outils de génétique moléculaire
http://genet.univ-tours.fr/fichiers_de_base/gen001300.HTM
- 112)** Laboratoire de cytogénétique et génétique moléculaire humaine et laboratoire SESPE
Support de cours .Université Versailles st Quentin en Evyline
http://www.sesep.uvsq.fr/formation/cours_online.html
- 113)** Dembele D. (2005)
Cours de Bioinformatique
IGBM, CNRS, Strasbourg France

ANNEXES

ANNEXE 1 : MARQUEURS MOLECULAIRES UTILISES POUR LE GENOTYPAGE DE CCR5

Amorce Aller



Integrated DNA Technologies, Inc.

Oligonucleotide Specification Sheet

08/11/2004

1710 Commercial Park
Coralville, IA 52241-2760
800-328-2661
Fax: 319-626-8444
orders@idtdna.com
www.idtdna.com

Order No. **1090073**

Ref. No. **12543499**

Sequence - CCR5- 32 Classique p

25 nmole DNA Oligo, Standard Desalting, 24 bases

5'- CAA AAA GAA GGT CTT CAT TAC ACC -3'

Properties

T_m (50mM NaCl): 52.3 °C
GC Content: 37. %
Molecular Weight: 7,313.8
nmoles/OD260: 4.2
ug/OD260: 30.4
Ext. Coefficient: 240,200 L/(mole*cm)

Amount Of Oligo

4.3 = 17.90 = 0.13
OD 260 nMoles mg

Shipped To

FRAN KROGSTAD
TULANE UNIVERSITY HEALTH SCIENCES C
333 S LIBERTY ST
NEW ORLEANS, LA 70112
USA
5045885190
Customer No. 41116 PO No. Credit Card

Oligo Base Types

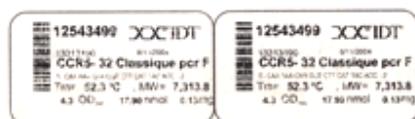
DNA bases 24

Modifications And Services

Standard Desalting 1

MASS SPEC.

Mfg. ID 12313190 Labels - Peel Here



I N S T R U C T I O N S

- Lyophilized contents may appear as either a translucent film or a white powder. This variance does not affect the quality of the oligo
- Please centrifuge tubes prior to opening. Some of the product may have been dislodged during shipping.

M

Amorce retour



Integrated DNA Technologies, Inc.
Oligonucleotide Specification Sheet

1710 Commercial Park
Coralville, IA 52241-2760
800-328-2661
Fax: 319-626-8444
orders@idtdna.com
www.idtdna.com

08/11/2004

Order No. **1090073**

Ref. No. **12543500**

Sequence - CCR5- 32 Classique p 25 nmole DNA Oligo, Standard Desalting, 24 bases

5'- CCT GTG CCT CTT CTT CTC ATT TCG -3'

Properties	Amount Of Oligo	Shipped To
T _m (50mM NaCl): 57.7 °C GC Content: 50 % Molecular Weight: 7,187.7 nmoles/OD260: 5.1 ug/OD260: 36.4 Ext. Coefficient: 197,700 L/(mole-cm)	5.3 = 26.81 = 0.19 OD 260 nMoles mg	FRAN KROGSTAD TULANE UNIVERSITY HEALTH SCIENCES C 333 S LIBERTY ST NEW ORLEANS, LA 70112 USA 5045885190 Customer No. 41116 PO No. Credit Card

Oligo Base Types	Quantity
DNA bases	24

Modifications And Services	Quantity
Standard Desalting	1

MASS SPEC.
Mfg. ID 13313291 Labels - Peel Here

12543500 IDT
13313291
CCR5- 32 Classique per R
5'- CCT GTG CCT CTT CTT CTC ATT TCG -3'
T_m= 57.7 °C MW= 7,187.7
5.1 OD₂₆₀ 36.41 ug/OD 0.19 mg

12543500 IDT
13313291
CCR5- 32 Classique per R
5'- CCT GTG CCT CTT CTT CTC ATT TCG -3'
T_m= 57.7 °C MW= 7,187.7
5.1 OD₂₆₀ 36.41 ug/OD 0.19 mg

I N S T R U C T I O N S

- Lyophilized contents may appear as either a translucent film or a white powder. This variance does not affect the quality of the oligo
- Please centrifuge tubes prior to opening. Some of the product may have been dislodged during shipping.

M

ANNEXE 2: PROTOCOLES DE L'ETUDE

A-PROTOCOLE DE LYMPHOSEPARATION

Technologie: Lymphoprep™ (Axis Shield) Prod. No: 1031967

Matériel :

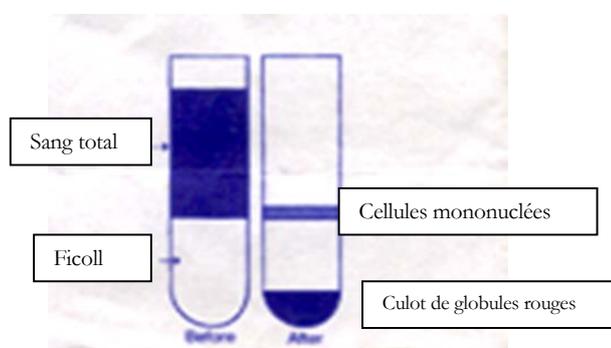
- Centrifugeuse 5810R (eppendorf)
- Tubes Corning de 15ml
- Cryotubes de 2ml
- Pipettes pasteur

Mode opératoire :

- Dans des tubes différents (Corning) prélever un volume de ficoll pour deux volumes de sang. (exemple : 2.5ml/5ml).
- A l'aide d'une pipette pasteur déposer délicatement le sang à la surface du Ficoll en évitant que les deux substances se mélangent.
- Centrifuger le tout 800g pendant 20 minutes à température comprise entre 20 et 25 C°.
- Après centrifugation, prélever délicatement les cellules mononuclées rassemblées en un anneau surnageant le Ficoll et les transférer dans des cryotubes.

En cas de contamination des cellules mononuclées par les globules rouges, les laver 2 à 3 fois par ajout d'un même volume de PBS 1X (Phosphate Buffered Saline) suivi d'une centrifugation à 800g pendant 10 mn.

Avant centrifugation / Après centrifugation



B-PROTOCOLE D'EXTRACTION DE L'ADN GENOMIQUE

Technologie : *GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma, St Louis, Mo).*

Matériel :

Bain mari
Centrifugeuse 5410c (Eppendorf)
Pipettes de 100 et 1000µl
Tubes de collection (fourni par le fabricant)
Vortex
Papier absorbant

Mode opératoire :

- Prélever 500µl de culot leucocytaire dans un tube de 2 ml
- Ajouter 200µl de solution de suspension au culot
- Ajouter 20µl de solution de protéinase K (enzyme dénaturant les protéines) et vortexer
Brièvement.
- Ajouter 200µl de solution de lyse C.
- Incuber la solution à 55°C au bain-marie pendant 10 minutes.

Préparation de la colonne

- Ajouter 500µl de la solution de préparation dans la colonne
- Centrifuger à 11400 tours/ min pendant 10 secondes.

Transfert dans la colonne

- Ajouter au lysat (solution incubée) 200µl d'éthanol pure et homogénéiser au vortex pendant 10 secondes.
- Transférer la solution dans la colonne traitée. Centrifuger à plus de 8400 tours/ min pendant une minute.

Phase de lavage pour éliminer les contaminants

- Placer la colonne dans un nouveau tube de 2 ml.
- Ajouter 500µl de la solution de lavage (préalablement diluée avec de l'éthanol) dans la colonne et centrifugée à plus de 8400 tours/ min pendant une minute.
- Transférer ensuite la colonne dans un nouveau tube de 2 ml.
- Procéder à un second lavage avec 500µl de solution de lavage puis centrifuger à plus de 13000 tours/min pendant 3 minutes.
- Sécher la colonne avec du papier absorbant et la replacer dans nouveau tube de 2 ml pour l'élution.

Phase d'élution

- Ajouter 200µl de solution d'élution directement au centre de la colonne et laisser reposer 5 minutes.
- Centrifuger à plus de 8400 tours/ min pendant une minute. L'ADN génomique est recueilli au fond du tube

C-PROTOCOLE DE PURIFICATION D'ADN A PARTIR DE GEL D'AGAROSE

Technologie : *MinElute Gel extraction Kit (QIAGEN)*

Ce protocole est conçu pour purifier des fragments d'ADN double brin (70pb à 4 kb) provenant de gel d'agarose standard au TAE ou au TBE.

Matériel :

Isopropanol

Bain-marie

Centrifugeuse (5417C eppendorf)

Tubes 1.5 ml

Pipettes 100 et 1000 µl

Balance de précision

Mode opératoire :

Toutes les centrifugations seront faites à >10000 g (13000 rpm)

- Couper les fragments d'ADN du gel avec un scalpel propre. Réduire au maximum l'excès de gel autour des fragments d'ADN.
- Peser les morceaux découpés dans des tubes de collection incolores. Ajouter 3 volumes de Buffer QG pour un volume de gel. (exple : 300 µl de Buffer QG pour 100 mg de gel).
- Incuber à 55°C au bain-marie pendant 10 minutes. (ou jusqu'à ce que le gel se dissolve complètement) pour faciliter la dissolution du gel, vortexer toute les 2 à 3 minutes durant l'incubation.
- Après dissolution complète du morceau de gel d'agarose, s'assurer que la couleur jaune de la mixture identique à celle du Buffer QG.
- Ajouter une fois le volume du gel en isopropanol à l'échantillon. (exple : 100 µl d'isopropanol pour 100mg de gel. Ne pas centrifuger a cette étape.
- Placer la colonne MinElute dans un tube de collection de 2ml fournit dans le kit.
- Pour fixer l'ADN, transfère la mixture dans la colonne et centrifuger pendant 1 minute.

(Pour un bon rendement transférer toutes les traces de la mixture dans la colonne. Utiliser plusieurs colonnes si nécessaires.)

- Rejeter le filtrat et placer la colonne dans le même tube de collecte.
- Ajouter 500 µl de Buffer QG dans la colonne et centrifuger pendant 1 minute.
- Rejeter le filtrat et placer la colonne dans le même tube de collecte.
- Pour le Lavage, ajouter 750 µl de Buffer PE dans la colonne et centrifuger pendant 1 minute.
- Rejeter le filtrat et centrifuger encore pendant 1 minute.
- Placer la colonne dans tube de 1.5ml propre.
- Pour l'éluion de l'ADN, ajouter, dans la colonne au centre de la membrane, 10 µl de Buffer EB (10 mM Tris Cl, pH 8.5) ou d'eau pure. Laisser reposer pendant 1 minute et centrifuger pendant une minute.

- **D-PROTOCOLE DE PURIFICATION D'ADN SUR RESINE SEPHADEX® G-50 SUPER FINE**

PRINCIPE :

Purifier par gel filtration des produits de PCR ou des réactions de séquence avant injection sur séquenceur capillaire.

MATERIEL :

- Eau ultra pure ou eau MilliQ : eau de laboratoire purifiée par le système MilliQ de Millipore. (Test de conductivité 18M./cm.)

- Sephadex® G-50 DNA Grade Super Fine **Amersham Biosciences** (ref.# 17-0041-01)

-Matériel Millipore:

MultiScreen-HV, format HTS Clear Plates

MultiScreen column loader 45 µl

MultiScreen column loader scraper

MultiScreen centrifuge alignment frame

MODE OPERATOIRE :

1-Chargement de la résine sèche Sephadex® G-50 Superfine dans la plaque MultiScreen HV.

(Utiliser le chargeur de colonne de 45 µl)

- Déposer la résine Sephadex® G 50 dans chaque puits (45µl) du chargeur de colonne.

- Retirer l'excès de résine avec la raclette.

- Placer la plaque MultiScreen HV à l'envers sur le chargeur jusqu'au butoir et retourner l'ensemble.

- Taper sur le chargeur pour évacuer la résine vers la plaque.

- Ajouter 300 µl d'eau ultra pure dans chaque puits contenant de la résine, fermer la plaque avec son couvercle et laisser incubé 3 heures à température ambiante.

(Une fois les mini-colonnes gonflées dans la plaque MultiScreen, elles peuvent être stockées à 4 °C. Pour plus de deux semaines, stocker les plaques entourées de parafilm ou dans une boîte en plastique étanche contenant un élément qui assurera une atmosphère humide et limitera ainsi le dessèchement des colonnes.)

2- Filtration des produits d'amplification ou des réactions de séquence

- Placer la plaque MultiScreen HV sur une plaque de micro-titration de 96 puits (Beckman ref.# 609844) et centrifuger l'ensemble 5 minutes à 910 g pour éliminer l'eau et compacter les mini-colonnes.

- Le produit de PCR ou la réaction de séquence est si besoin dilué avec un volume d'eau ultra pure.

- Déposer délicatement les échantillons à purifier au centre des mini-colonnes.

- Placer la plaque MultiScreen HV sur une plaque de polypropylène au format standard 96 et centrifuger 5 minutes à 910 g. Les filtrats contiennent les produits purifiés dans l'eau.

Selon l'état de la résine, un certain pourcentage du volume déposé de la solution d'ADN peut être perdu. Dans le cas des réactions de séquence, toujours vérifier si le volume récupéré dans certains puits n'est pas trop faible. Pour éviter des problèmes lors de l'injection dans le séquenceur, ajouter 4 à 5 µl d'eau milliQ dans ces échantillons.

**ANNEXE 3 : SEQUENCES CCR5 DE REFERENCE
(BANQUES DE DONNEES NCBI)**

- 1: Homo sapiens CCR5 chemokine receptor (CCR5) gene, complete cds
gi|42540826|gb|AY463215.1|[42540826]
- 2: Homo sapiens CCR5 chemokine receptor (CCR5) gene, complete cds
gi|42540824|gb|AY463214.1|[42540824]
- 3: Homo sapiens C-C chemokine receptor type 5 (CCR5) gene, complete cds
gi|77702079|gb|DQ217934.1|[77702079]
- 4: Homo sapiens mutant CCR5 chemokine receptor (CCR5) gene, complete cds
gi|58004748|gb|AY744141.1|[58004748]
- 5: Homo sapiens chemokine (C-C motif) receptor 5 (CCR5), mRNA
gi|4502638|ref|NM_000579.1|[4502638]
- 6: Homo sapiens chemokine (C-C motif) receptor 5, mRNA (cDNA clone MGC:34624
IMAGE:5186388), complete cds
gi|23512230|gb|BC038398.1|[23512230]
- 7: Homo sapiens clone G7 C-C chemokine receptor 5 (CCR5) gene, partial cds
gi|5712813|gb|AF161921.1|[5712813]
- 8: Homo sapiens clone G6 C-C chemokine receptor 5 (CCR5) gene, partial cds
gi|5712812|gb|AF161920.1|[5712812]
- 9: Homo sapiens clone F4 C-C chemokine receptor 5 (CCR5) gene, partial cds
gi|5712811|gb|AF161919.1|[5712811]
- 10: Homo sapiens clone F3 C-C chemokine receptor 5 (CCR5) gene, partial cds
gi|5712810|gb|AF161918.1|[5712810]
- 11: Homo sapiens clone F1.1 C-C chemokine receptor 5 (CCR5) gene, partial cds
gi|5712809|gb|AF161917.1|[5712809]
- 12: Homo sapiens clone JM-1 C-C chemokine receptor 5 (CCR5) gene, partial cds
gi|5712807|gb|AF161915.1|[5712807]
- 13:

- Homo sapiens clone 9/8.2 C-C chemokine receptor 5 (CCR5) gene, partial cds
gi|5712806|gb|AF161914.1|[5712806]
- 14: Homo sapiens clone 6-53 C-C chemokine receptor 5 (CCR5) gene, partial cds
gi|5712805|gb|AF161913.1|[5712805]
- 15: Homo sapiens clone 5-53 C-C chemokine receptor 5 (CCR5) gene, partial cds
gi|5712804|gb|AF161912.1|[5712804]
- 16: Homo sapiens clone 4-55 C-C chemokine receptor 5 (CCR5) gene, partial cds
gi|5712803|gb|AF161911.1|[5712803]
- 17: Homo sapiens clone 4-53 C-C chemokine receptor 5 (CCR5) gene, partial cds
gi|5712802|gb|AF161910.1|[5712802]
- 18: Homo sapiens clone 3-55 C-C chemokine receptor 5 (CCR5) gene, partial cds
gi|5712801|gb|AF161909.1|[5712801]
- 19: Homo sapiens chromosome 3 clone RP11-24F11, complete sequence
gi|22038607|gb|AC098613.2|[22038607]
- 20: Homo sapiens isolate ZwCCR5-14 CCR5 receptor (CCR5) mRNA, partial cds
gi|2305189|gb|AF011536.1|AF011536[2305189]
- 21: Homo sapiens isolate ZwCCR5-13 CCR5 receptor (CCR5) mRNA, partial cds
gi|2305187|gb|AF011535.1|AF011535[2305187]
- 22: Homo sapiens isolate ZwCCR5-112 CCR5 receptor (CCR5) mRNA, partial cds
gi|2305185|gb|AF011534.1|AF011534[2305185]
- 23: Homo sapiens isolate ZwCCR5-110 CCR5 receptor (CCR5) mRNA, partial cds
gi|2305183|gb|AF011533.1|AF011533[2305183]
- 24: Homo sapiens isolate UgCCR5-145d CCR5 receptor (CCR5) mRNA, partial cds
gi|2305181|gb|AF011532.1|AF011532[2305181]
- 25: Homo sapiens isolate UgCCR5-145c CCR5 receptor (CCR5) mRNA, partial cds
gi|2305179|gb|AF011531.1|AF011531[2305179]
- 26:

- Homo sapiens isolate UgCCR5-144c CCR5 receptor (CCR5) mRNA, partial cds
gi|2305173|gb|AF011528.1|AF011528[2305173]
- 27: Homo sapiens isolate UgCCR5-144b CCR5 receptor (CCR5) mRNA, partial cds
gi|2305171|gb|AF011527.1|AF011527[2305171]
- 28: Homo sapiens isolate UgCCR5-144a CCR5 receptor (CCR5) mRNA, partial cds
gi|2305169|gb|AF011526.1|AF011526[2305169]
- 29: Homo sapiens isolate TzCCR5-181a CCR5 receptor (CCR5) mRNA, partial cds
gi|2305167|gb|AF011525.1|AF011525[2305167]
- 30: Homo sapiens isolate TzCCR5-178b CCR5 receptor (CCR5) mRNA, partial cds
gi|2305163|gb|AF011523.1|AF011523[2305163]
- 31: Homo sapiens isolate TzCCR5-178a CCR5 receptor (CCR5) mRNA, partial cds
gi|2305161|gb|AF011522.1|AF011522[2305161]
- 32: Homo sapiens isolate ThCCR5-6 CCR5 receptor (CCR5) mRNA, partial cds
gi|2305159|gb|AF011521.1|AF011521[2305159]
- 33: Homo sapiens isolate ThCCR5-5 CCR5 receptor (CCR5) mRNA, partial cds
gi|2305157|gb|AF011520.1|AF011520[2305157]
- 34: Homo sapiens isolate ThCCR5-2 CCR5 receptor (CCR5) mRNA, partial cds
gi|2305155|gb|AF011519.1|AF011519[2305155]
- 35: Homo sapiens isolate ThCCR5-113 CCR5 receptor (CCR5) mRNA, partial cds
gi|2305153|gb|AF011518.1|AF011518[2305153]
- 36: Homo sapiens isolate RwCCR5-105 CCR5 receptor (CCR5) mRNA, partial cds
gi|2305151|gb|AF011517.1|AF011517[2305151]
- 37: Homo sapiens isolate MwCCR5-1568 CCR5 receptor (CCR5) mRNA, partial cds
gi|2305149|gb|AF011516.1|AF011516[2305149]
- 38: Homo sapiens isolate MwCCR5-1567 CCR5 receptor (CCR5) mRNA, partial cds
gi|2305147|gb|AF011515.1|AF011515[2305147]
- 39:

- Homo sapiens isolate MwCCR5-1555 CCR5 receptor (CCR5) mRNA, partial cds
gi|2305145|gb|AF011514.1|AF011514[2305145]
- 40: Homo sapiens isolate MwCCR5-1553 CCR5 receptor (CCR5) mRNA, partial cds
gi|2305143|gb|AF011513.1|AF011513[2305143]
- 41: Homo sapiens isolate MwCCR5-107 CCR5 receptor (CCR5) mRNA, partial cds
gi|2305141|gb|AF011512.1|AF011512[2305141]
- 42: Homo sapiens isolate KeCCR5-3a CCR5 receptor (CCR5) mRNA, partial cds
gi|2305137|gb|AF011510.1|AF011510[2305137]
- 43: Homo sapiens isolate KeCCR5-111 CCR5 receptor (CCR5) mRNA, partial cds
gi|2305133|gb|AF011508.1|AF011508[2305133]
- 44: Homo sapiens isolate InCCR5-72a CCR5 receptor (CCR5) mRNA, partial cds
gi|2305131|gb|AF011507.1|AF011507[2305131]
- 45: Homo sapiens isolate InCCR5-71b CCR5 receptor (CCR5) mRNA, partial cds
gi|2305129|gb|AF011506.1|AF011506[2305129]
- 46: Homo sapiens isolate InCCR5-71a CCR5 receptor (CCR5) mRNA, partial cds
gi|2305127|gb|AF011505.1|AF011505[2305127]
- 47: Homo sapiens isolate InCCR5-46 CCR5 receptor (CCR5) mRNA, partial cds
gi|2305125|gb|AF011504.1|AF011504[2305125]
- 48: Homo sapiens isolate InCCR5-467 CCR5 receptor (CCR5) mRNA, partial cds
gi|2305123|gb|AF011503.1|AF011503[2305123]
- 49: Homo sapiens isolate InCCR5-463 CCR5 receptor (CCR5) mRNA, partial cds
gi|2305121|gb|AF011502.1|AF011502[2305121]
- 50: Homo sapiens isolate HtCCR5-104 CCR5 receptor (CCR5) mRNA, partial cds
gi|2305117|gb|AF011500.1|AF011500[2305117]

FICHE SIGNALÉTIQUE

FICHE SIGNALÉTIQUE DE LA THÈSE

Nom : COULIBALY **Prénom :** KARIM

Titre de la Thèse : Génotypage et exploration du polymorphisme nucléotidique de CCR5, récepteur de chimiokines et corécepteur majeur du VIH-1, à Bamako.

Année : 2005-2006

Pays : MALI

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'OdontoStomatologie (FMPOS). Université de Bamako.

Secteur d'intérêt : Génétique de la résistance au VIH/SIDA.

Résumé :

L'entrée du VIH dans ses cellules cibles requiert à la fois la molécule CD4 comme récepteur principal et un récepteur de chimiokines comme co-récepteur. Selon leurs tropisme cellulaire, les virus utilisent l'un ou l'autre des deux corécepteurs majeurs CCR5 et CXCR4. CCR5 étant impliqué majoritairement dans les primo-infections. Ainsi une délétion homozygote de 32 paires de bases dans le gène codant pour CCR5 a été décrite chez des sujets qui demeurent non infectés malgré de multiples expositions au virus (1% des populations caucasiennes) Le génotype hétérozygote, sans empêcher l'infection, retarderait considérablement sa progression vers le SIDA. Cet allèle de résistance naturelle à l'infection serait rare chez les populations d'origines africaine et asiatique. Néanmoins des cas de résistance à l'infection chez des non porteurs de la dite mutation ont été rapportés.

Le but de cette étude, menée à Bamako chez des sujets africains, était de faire le génotypage de CCR5 d'une part et d'explorer le polymorphisme nucléotidique d'une portion du gène CCR5 contenant le site de la délétion delta 32 d'autre part.

Trois groupes extrêmes de sujets selon le statut VIH/SIDA ont été testés. A savoir 100 séropositifs malades du Sida, 30 séropositifs asymptomatiques et 100 séronégatifs exposés. Pour le génotypage, une portion du gène CCR5 contenant le site potentiel de la mutation delta 32 a été amplifiée par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose. L'exploration du polymorphisme nucléotidique a été faite par séquençage automatique direct des amplicons de la PCR de génotypage.

Tous les sujets de l'étude (100%) ont été génotypés homozygotes pour l'allèle normal sans la délétion Δ 32. L'analyse des séquences d'ADN tout en confirmant le génotype a mis en évidence des divergences 1 à 4% entre les échantillons. Les séquences des malades et celles des séronégatifs présentent de fortes homologies, malgré quelques mutations mononucléotidiques isolées. Celles des sujets VIH-1⁺ asymptomatiques présentent toutes une même zone de micro hétérogénéité entre les positions 139 et 152.

Ces résultats qui confirment la rareté de la mutation de résistance CCR5 Δ 32 chez les populations africaines pourraient en partie expliquer l'ampleur de la pandémie du SIDA en Afrique noire. L'évaluation du polymorphisme nucléotidique suggère aussi la présence probable d'autres mutations ponctuelles dans cette portion du gène CCR5. Il serait important de les caractériser et d'étudier leurs effets éventuels sur l'expression d'un récepteur fonctionnel et surtout sur l'évolution de l'infection chez ceux qui les portent.

Mots Clés : VIH/SIDA, corécepteurs, CCR5, résistance naturelle, PCR, séquençage

SERMENT DE GALIEN

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 des 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.

Je le jure