

MINISTERE DES ENSEIGNEMENTS  
SECONDAIRE SUPERIEUR ET DE  
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

REPUBLIQUE DU MALI  
Un Peuple - Un But - Une Foi

ECOLE NATIONALE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DU MALI

ANNEE 1995-1996

N°.....12.....

# PREVALENCE DU VIH-1 GROUPE O AU MALI: RESULTATS PRELIMINAIRES

## THESE

Présentée et soutenue publiquement le.....

Devant

L'Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie du Mali

Par

Mr: Henri ELOUNDOU NKA  
pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie  
(DIPLOME D'ETAT)

### Jury

**PRESIDENT:** Professeur Aly GUINDO

**MEMBRES:** Docteur Yeya Issa MAÏGA  
Docteur Eric DELAPORTE

**DIRECTEUR DE THESE:** Professeur Bréhima KOUMARE

ECOLE NATIONALE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DU MALI  
ANNEE UNIVERSITAIRE 1995-1996

ADMINISTRATION

DOYEN : ISSA TRAORE - PROFESSEUR  
1er ASSESSEUR: BOUBACAR S.CISSE - PROFESSEUR  
2ème ASSESSEUR : AMADOU DOLO - MAITRE DE CONFERENCES AGREGE  
SECRETAIRE GENERAL: BAKARY CISSE - MAITRE DE CONFERENCES  
ECONOME: MAMADOU DIANE CONTROLEUR DES FINANCES

LES PROFESSEURS HONORAIRES

Mr Aliou BA	Ophtalmologie
Mr Bocar SALL	Ortho-Traumato.Sécourisme
Mr Souléymane SANGARE	Pneumo-phtisiologie
Mr Yaya FOFANA	Hématologie
Mr Mamadou L.TRAORE	Chirurgie Générale
Mr Balla COULIBALY	Pédiatrie

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

D.E.R.CHIRURGIE ET SPECIALITES CHIRURGICALES

1. PROFESSEURS

Mr Abdel Karim KOUMARE	Chef D E R de Chirurgie
Mr Sambou SOUMARE	Chirurgie Générale
Mr Abdou Alassane TOURE	Ortho-Traumatologie
Mr Kalilou OUATTARA	Urologie

2. MAITRE DE CONFERENCES AGREGES

Mr Amadou DOLO	Gynéco-Obstétrique
Mr Djibril SANGARE	Chirurgie Générale
Mr Abdel Kader TRAORE Dit DIOP	Chirurgie Générale

3. MAITRE DE CONFERENCES

Mme SY Aissata SOW	Gynéco-Obstétrique
Mr Salif Diakité	Gynéco-Obstétrique

4. ASSISTANTS CHEF DE CLINIQUE

Mr Mamadou L. DIOMBANA	Stomatologie
Mr Abdoulaye DIALLO	Ophtalmologie
Mr Alhousséini Ag MOHAMED	O.R.L.
Mme DIALLO Fatimata.S. DIABATE	Gynéco-Obstétrique
Mr Abdoulaye DIALLO	Anesth.-Réanimation
Mr Gangaly DIALLO	Chirurgie Générale

Mr Sékou SIDIBE  
Mr Abdoulaye K.DIALLO  
Mr Mamadou TRAORE  
Mr Filifing SISSOKO  
Mr Tiéman COULIBALY  
Mme TRAORE J.THOMAS  
Mr Nouhoum ONGOIBA

Ortho.Traumatologie  
Anesthésie-Réanimation  
Gynéco-Obstétrique  
Chirurgie Générale  
Ortho.Traumatologie  
Ophtalmologie  
Anatomie & Chirurgie Générale

#### 5. ASSISTANTS

Mr Ibrahim ALWATA  
Mr Sadio YENA

Ortho.Traumatologie  
Chirurgie Générale

### D.E.R. DE SCIENCES FONDAMENTALES

#### 1. PROFESSEURS

Mr Bréhima KOUMARE  
Mr Siné BAYO  
Mr Gaoussou KANOUTE  
Mr Yéya T.TOURE  
Mr Amadou DIALLO  
Mr Moussa HARAMA

Bactériologie-Virologie  
Anatomie-Path.Histoembryologie  
Chimie analytique  
Biologie  
Biologie Chef de D.E.R.  
Chimie Organique

#### 2. MAITRE DE CONFERENCES AGREGE

Mr Ogobara DOUMBO  
Mr Anatole TOUNKARA

Parasitologie  
Immunologie

#### 3. MAITRE DE CONFERENCES

Mr Yénimégué A.DEMBELE  
Mr Massa SANOGO  
Mr Bakary M.CISSE  
Mr Abdrahamane S.MAIGA  
Mr Adama DIARRA

Chimie Organique  
Chimie Analytique  
Biochimie  
Parasitologie  
Physiologie

#### 4. MAITRES ASSISTANTS

Mr Mahamadou CISSE  
Mr Sekou F.M.TRAORE  
Mr Abdoulaye DABO  
Mr N'yenigie Simon KOITA  
Mr Abdrahamane TOUNKARA  
Mr Flabou BOUGOUDOGO  
Mr Amadou TOURE  
Mr Ibrahim I.MAIGA

Biologie  
Entomologie médicale  
Malacologie,Biologie Animale  
Chimie organique  
Biochimie  
Bactériologie  
Histoembryologie  
Bactériologie

#### 5. ASSISTANTS

Mr Benoît KOUMARE

Chimie Analytique

## D.E.R.DE MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES

### 1. PROFESSEURS

Mr Abdoulaye Ag RHALY	Med.Int. Chef D E R MEDECINE
Mr Aly GUINDO	Gastro-Enterologie
Mr Mamadou K. TOURE	Cardiologie
Mr Mahamane MAIGA	Néphrologie
Mr Ali Nouhoum DIALLO	Médecine Interne
Mr Baba KOUMARE	Psychiatrie
Mr Moussa TRAORE	Neurologie
Mr Issa TRAORE	Radiologie
Mr Mamamdou M. KEITA	Pédiatrie

### 2. MAITRE DE CONFERENCES AGREGE

Mr Toumani SIDIBE	Pédiatrie
Mr Bah KEITA	Pneumo-Phthysiologie
Mr Boubacar DIALLO	Cardiologie
Mr Dapa Aly DIALLO	Hématologie

### 3. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Mr Abdel Kader TRAORE	Med.Interne
Mr Moussa Y.MAIGA	Gastroenterologie
Mr Somita KEITA	Dermato-Leprologie
Mr Hamar A. TRAORE	Medecine Interne
Mr Bou DIAKITE	Psychiatrie
Mr Bougouzié SANOGO	Gastroenterologie
Mr Mamady KANE	Radiologie
Mr Saharé FONGORO	Néphrologie
Mr Bakoroba COULIBALY	Psychiatrie

### 3. ASSISTANTS

Mr Mamadou DEMBELE	Médecine Interne
Mr Adama D.KEITA	Radiologie
Mme Tatiana KEITA	Pédiatrie

## D E R de SCIENCES PHARMACEUTIQUES

### 1.PROFESSEURS

Mr Boubacar Sidiki CISSE	Toxicologie
--------------------------	-------------

### 2. MAITRE DE CONFERENCES AGREGE

Mr Arouna KEITA	Matière Médicale
-----------------	------------------

### 3. MAITRE DE CONFERENCES

Mr Boukassoum HAIDARA	Législation
Mr Ousmane DOUMBIA	Pharm.Chim. (Chef de D.E.R.)
Mr Elimane MARIKO	Pharmacologie

### 3. MAITRE ASSISTANT

Mr Drissa DIALLO  
Mr Alou KEITA

Matières Médicales  
Galénique

### 4. ASSISTANT

Mr Ababacar I. MAIGA

Toxicologie

## D.E.R. DE SANTE PUBLIQUE

### 1. PROFESSEUR

Mr Sidi Yaya SIMAGA

Santé Publique (chef D.E.R.)

### 2. MAITRE DE CONFERENCES AGREGE

Mr Moussa A. MAIGA

Santé Publique

### 3. MAITRE DE CONFERENCES

Mr Yanick JAFFRE  
Mr Sanoussi KONATE

Anthropologie  
Santé Publique

### 4. MAITRES ASSISTANTS

Mr Bocar G. TOURE  
Mr Sory I. KABA

Santé Publique  
Santé Publique

### 5. ASSISTANT

Mr Massambou SACKO

Santé Publique

## CHARGES DE COURS & ENSEIGNANTS VACATAIRES

Mr Mamadou KONE	Physiologie
Mr Kaourou DOUCOURE	Biologie
Mr N'Golo DIARRA	Botanique
Mr Bouba DIARRA	Bactériologie
Mr Salikou SANOGO	Physique
Mr Daouda DIALLO	Chimie Générale et Min.
Mr Bakary I. SACKO	Biochimie
Mr Sidiki DIABATE	Bibliographie
Mr Boubacar KANTE	Galénique
Mr Souléymanne GUINDO	Gestion
Mme Sira DEMBELE	Mathématiques
Mr Modibo DIARRA	Nutrition
Mme MAIGA Fatoumata SOKONA	Hygiène du Milieu
Mr Nyamanton DIARRA	Mathématiques
Mr Moussa I. DIARRA	Biophysique
Mr Mamadou Bakary DIARRA	Cardiologie

## PERSONNEL D' ENCADREMENT ( STAGES & TP)

Docteur Madani TOURE

H.G.T.

Docteur Tahirou BA	H.G.T.
Docteur Amadou MARIKO	H.G.T.
Docteur Badi KEITA	H.G.T.
Docteur Antoine NIANTAO	H.G.T.
Docteur Kassim SANOGO	H.G.T.
Docteur Yéya I.MAIGA	I.N.R.S.P.
Docteur Chompere KONE	I.N.R.S.P.
Docteur Almahdy DICKO	P.M.I.SOGONINKO
Docteur Mohamed TRAORE	KATI
Docteur Reznikoff	IOTA
Docteur N'DIAYE F. N'DIAYE	IOTA
Docteur Hamidou B.SACKO	HGT
Docteur Hubert BALIQUE	C.T. MSSPA
Docteur Sidi Yéhiya TOURE	HGT
Docteur Youssouf SOW	HGT

### ENSEIGNANTS EN MISSION

Pr F.S.DANO	HYDROLOGIE
Pr M.L.SOW	MED.LEGALE
Pr S.S.GASSAMA	BIOPHYSIQUE
Pr D. BA	BROMATOLOGIE
Pr M.BADIANE	PHARMACIE CHIMIQUE
Pr B.FAYE	PHARMACODYNAMIE
Pr Eric PICHARD	PATHOLOGIE INFECTIEUSE
Dr G.FARNARIER	PHYSIOLOGIE

## **DEDICACES**

### **A mon sauveur et seigneur Jesus Christ**

Pour tes bontés à mon endroit qui ne sont pas épuisées et qui ne tariront jamais.  
Pour tes compensations à mon égard qui ne parviendront jamais à leur terme.  
Pour ton amour insondable dans lequel je me perds tellement il est grand et profond.  
Bref que dire ? pour ta vie que tu as donnée pour moi.  
Que ton nom soit à jamais élevé ! Alleluia ! Alleluia ! Alleluia !

### **A mon père et mère Janvier et Valerie ELOUNDOU:**

Il serait illusoire de ma part d'exprimer par des mots ma reconnaissance. En effet comme le petit oiseau reçoit sa nourriture du bec de sa mère, ainsi j'ai tout reçu de vous. Je n'ai manqué de rien pendant mon séjour malien parce que vous vous êtes privés. Que ce travail ainsi que ma carrière vous apporte en retour satisfaction.  
Papa et Maman que Dieu vous bénisse abondamment pour ce que vous avez fait pour moi.

**A maman Marie:** Tu n'est certe pas celle qui m'a donné la vie. Mais j'ai trouvé en toi une maman . Viens trouvé dans ce modeste travail l'expression de ma reconnaissance.

### **A ma Grand mère Josephine AMBONO**

Viens trouver ici l'expression de l'amour et de l'attachement que te témoigne l'un de tes petits fils.

**A mes frères et soeurs: Charles NKA, Cyrile ELOUNDOU, Clément NKOA, Mariette ELOUNDOU , Rachel NKOUSSA, Suzane NKOUSSA, Felicité ABOULA.**

J'aurais tant aimé que vous soyez là physiquement non seulement en ces moments solennels, mais aussi tout au long de la réalisation de ce travail.

Qu'à cela ne tienne vous y avez participé et ceci autrement: le lien de sang fait tout.  
Ce travail est donc aussi le votre. J'ai posé la fondation. Que l'Eternel vous donne d'aller plus loin et de faire mieux que moi.

### **A Monsieur et Madame Jean Pierre et Edith MVONDO.**

Vous êtes pour moi des aînés. venez vous joindre à ma joie.

**A mes tantes: Florentine LEBEGA, Anne NGONO.**

Vous êtes pour moi des mamans pleines de douceur et d'attention, venez trouver ici l'expression de mon attachement.

**A tous mes frères et soeurs en Christ du GBEE** en particulier à Jules Tagne, Leandres Dihehou, Achille Dougmene, Daniel Yalcoué, Jacques Amalet, Jean Fredy Manfoumbi, N'klaigar Ngarial,, Adelaïde Makaga, Cécile Orima Rendjombé, Marius Dignito.

Vous m'avez soutenu pendant les moments d'épreuves par vos prières; vous avez su créer autour de moi une famille, celle des rachetés de Christ. Je vous aime tous Saint Baisé.

**Aux pasteurs** Maurice Diarra; Denis Bordeneuve; Serge Renault; Michel Freyd; Jacques Guindo.

« L'homme ne vit pas seulement de pain, mais de toute parole qui sort de la bouche de Dieu ». C'est le Christ qui l'a dit. Vous m'aviez nourri par la parole de Christ, ce qui m'a encouragé, réconforté , consolé etc...

Venez trouver ici l'expression de mes remerciements. Que Dieu vous bénisse !

**A tous mes frères et soeurs en Christ** de l'Eglise des Assemblées de Dieu. Merci pour la communion fraternelle.

**A la soeur Madame OSAKUE Brigitte et à la soeur Claudette .**

Quelle spontanéité de votre part !

En effet vous m'aviez apporté une aide déterminante au moment où j'en avais précisément le plus besoin. Venez trouver ici l'expression de mes remerciements.

**A mes compatriotes de l'AEESCAM:**

La quête du savoir nous a arraché de notre cameroun natal. Bon courage et bonne réussite dans les études à tous.

**A Célestin AYANGMA:**

Je ne saurais te remercier pour ta participation déterminante dans les derniers moments la réalisation de ce travail. Que l'Eternel seul te récompense.



### **A Solange Montue**

J'ai été très sensible à ta disponibilité, et à ta sympathie, tu a participé à la réalisation de ce travail d'une manière toute simple mes toute particulière. Merci pour ce service.

### **A mes amis:**

Mambou Augustin, Pascal Sokoudjou, William Nkakapen, Charles Ayangma, Nestor Belek, Severin Noubissi, Jean-Michel Bollo etc.. Merci pour les liens que nous avons tissés que Dieu nous donne de les approfondir et de les mettre au service du Cameroun.

### **Au Docteur BABY et à Monsieur Ibrahim DICKO ainsi qu'à tout le personnel du laboratoire de sérologie de l'INRSP .**

Je ne saurais oublier l'accueil, la sympathie, la disponibilité, les conseils, bref l'ambiance fraternelle que vous aviez créée autour de moi pendant que je travaillais au laboratoire.

Venez trouver ici l'expression de ma reconnaissance. Que Jesus vous bénisse.

### **A mes connaissances Aïcha GUINDO, Youma BOUKANEM, Khady NDIAYE.**

Merci pour l'attachement que vous avez manifesté à ma modeste personne.

### **A Issa Fofana et à toute la famille Fofana.**

Je me suis senti à l'aise et en sécurité pendant tout le temps que j'ai logé chez vous. Merci pour l'hospitalité. Que l'Eternel vous récompense.

### **Au Mali**

Je garde de toi Mali un souvenir que personne ne viendra effacer. Au-delà de la science pharmaceutique que j'ai acquise sur ton sol, ton peuple m'a communiqué certaines valeurs humaines que j'ignorais: l'hospitalité, l'humilité, le respect des aînés et du prochain. Je ne saurais ignorer le plus important; c'est également sur ton sol que Christ est venu au devant de moi pour me racheter de ma vaine manière de vivre. Mali, que l'Eternel te bénisse et te fasse prospérer à tous égards.

### **A tous mes camarades de promotion.**

Nous avons suivi le même enseignement, nous avons connu les mêmes angoisses à l'approche des examens. Que nous connaissions tous la réussite, chacun dans sa carrière.

**Aux Membres du Jury**

**A mon maître et Président du jury**

**Le Professeur Aly GUINDO**

**Agrégé de Gastro-entérologie, Chef de Service de Médecine à l'Hôpital Gabriel Touré.**

L'accueil que vous nous aviez réservé ainsi que la spontanéité avec laquelle vous aviez accepté de présider le jury de cette thèse, malgré vos multiples occupations nous sont allés droit au coeur.

Permettez nous, en ce jour solennel, de vous témoigner toute notre reconnaissance.

**A mon maître et juge**

**Docteur Yeya Issa MAÏGA**

**Diplômé d'immunologie microbienne, de mycologie médicale.**

**D.E.R. de Biologie humaine**

**Doctorat d'Etat en Biologie humaine**

**Coordinateur du programme national de lutte contre le Sida au Mali.**

Vous nous aviez encouragé au moment où nous initions ce travail, votre présence dans ce jury témoigne de l'intérêt que vous portez à la question du Sida au Mali et à ce travail en particulier.

Permettez-nous de vous adresser nos sincères remerciements.

**A mon maître et juge**

**Docteur Eric DELAPORTE**

**Chef de service du laboratoire de retrovirus de l'ORSTOM à Montpellier.**

Vos qualités d'éminent virologue ne sont plus à démontrer. Les nombreuses publications dont vous êtes auteur ou co-auteur en témoignent. Vous nous faites, à nous et à toute l'Ecole de Médecine et de Pharmacie du Mali, un très grand honneur d'être présent dans ce jury.

Soyez-en vivement remercié.

**A mon Directeur de Thèse: Le Professeur Bréhima KOUMARE**

**Professeur de bactériologie-virologie à l'Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie du Mali.**

**Chef de service du laboratoire de bactériologie de l'Institut National de Recherche en Santé Publique**

Je garde de vous le souvenir d'un enseignant extrêmement dense et éloquent. Comme Directeur de thèse, vos qualités de chercheur, lecteur toujours branché sur la dernière publication ainsi que votre rigueur scientifique ont frappé mon admiration. Vous m'aviez communiqué par là l'amour de la microbiologie et la virologie.

Venez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

**« L'effet du Sida sur le population mondiale sera comparable à celui d'une arme nucléaire ».**

**Professeur TAKUSCI Umenai**

**Directeur de l'Ecole Internationale de Santé de l'Université de Tokyo, Japon.**

**« Et je vis venir un cheval blême. Son cavalier s'appelle la mort et il était suivi du séjour des morts. Il leur fut donné pouvoir sur le quart de la terre pour faire périr les hommes par l'épée, la famine, les épidémies... »**

Apocalypse 6, 7

# SOMMAIRE

	Pages
I/ INTRODUCTION	1
GENERALITES	3
A: Rappels sur l'organisation génomique du VIH-1	3
1- Morphologie	3
2- Organisation génomique	5
B/ Variabilité du VIH-1 et structure de la boucle V3.	8
C/ Principes des méthodes de typage des VIH	16
I-a: Exemple: Protocole de l'extraction de l'ADN.	16
I-b: Principe et méthode de la technique d'amplification génique (PCR)	19
D/ Plylogenie du gène Env	20
I- Le groupe M	20
II- Le groupe O	22
METHODOLOGIE	30
A: Echantillonnage	30
1- Critère d'inclusion	30
2- Critères d'exclusion	30
3- Collecte des sérums.	30
B/ Recherche pratique des virus du groupe O	31
1- Innotest VIH-1 groupe O (Innogenetic, Belgium)	31
2- Inno-Lia VIH-1 groupe O (Innogenetic, Belgium)	32
RESULTATS	35
DISCUSSIONS	48
CONCLUSION ET RECOMMANDATION	51
BIBLIOGRAPHIE	52
RESUME	58

## Symboles des Acides aminés

A	= Alanine
B	= Asparagine
C	= Cysteine
D	= Acide aspartique
E	= Acide glutamique
F	= Phenylalamine
G	= Glycine
H	= Histidine
I	= Isolencine
K	= Lysine
L	= Leucine
M	= Methionine
N	= Asparagine
P	= Proline
Q	= Glutamine
S	= Serine
T	= Thréonine
V	= Valine
W	= Triptophane
Y	= Tyrosine
Z	= Glutamine

## INTRODUCTION

C'est dans la période allant d'octobre 1980 à mai 1981 que furent présentés au monde médical les premiers cas de ce qui allait être ultérieurement appelé SIDA (Syndrome Immuno Déficience Acquis) (62). Depuis lors, de nombreux progrès ont été accomplis dans le domaine de la connaissance de la maladie et de son agent étiologique: le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine). Parallèlement, l'épidémie qui au départ se limitait dans les populations des pays occidentaux aux homosexuels et aux drogués, s'est étendue à toutes les classes d'âge et à toutes les couches de la société. Aujourd'hui elle touche la quasi totalité des pays de la planète et chaque jour qui passe voit le nombre de personnes contaminées augmenter, surtout en Afrique et en Asie. Il n'est pour s'en convaincre que de consulter quelques statistiques. En 1989 L'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) dénombrait 198165 cas de SIDA à travers le Monde. Ce chiffre est passé à 366455 cas deux ans plus tard soit près du double (4). On estime à plus de 20 millions le nombre des personnes infectées depuis le début de la pandémie (6). L'OMS estime que ce chiffre avoisinera les 40 millions en l'an 2000 (22).

Au Mali la situation n'est guère meilleure, l'on est passé d'un cas de SIDA avant 1986 à 106 nouveaux cas au cours de la période allant de Juin à Décembre 1989, 202 entre Juillet et Décembre 1992, et 112 entre Janvier et Mars 1994 (12). C'est dire l'ampleur du fléau qui menace l'ensemble de la population du globe, quand on sait que toute personne contaminée par le virus est appelée à mourir à plus ou moins brève échéance.

Face à ce grave problème de santé publique, le monde scientifique n'est pas resté indifférent. Plusieurs stratégies de lutte ont été mises en oeuvre. Elles vont de la prévention par l'éducation des masses à la recherche de vaccin et de médicaments efficaces.

Malgré l'acharnement des équipes de recherche, les travaux sur le vaccin connaissent des difficultés qui tiennent à la fois de la complexité, de la variabilité et de la diversité du virus (18,47). En effet, le VIH présente deux types: le type1 (VIH-1) et le type2 (VIH-2). Le type1 est formé de deux groupes: le groupe M qui comprend les sous-types A à I et le groupe O dont le nombre de souches encore restrintes est en train d'augmenter au fur et à mesure des recherches. Le type 2 comprend 5 sous-types de A à E (17). Devant cette diversité des isolats, l'OMS a mis en place un réseau chargé d'isoler et de caractériser des souches virales présentes en divers lieux. En vue de



préparer un vaccin qui sera adapté et spécifique à chaque souche. Ce travail se fait avec la collaboration de nombreuses autres équipes de recherche. (5, 30, 54, 64).

Des travaux entrepris dans cette optique en France, au Cameroun et au Gabon ont abouti d'abord en 1994 à l'isolement et à la caractérisation de trois souches virales: VIH-1 MVP5180, VIH-1 ant70, VIH-1 Vau (37, 39, 47). Ensuite, au courant de l'année 1995 sept autres souches ont été décrites (34,110). Ces dix souches sont très distantes des souches jusque là décrites formant le groupe M (majeur) du VIH-1. Ces nouvelles souches ont été assemblées en un nouveau groupe: le groupe dénommé O(outlier)du VIH-1 (10, 25, 37, 39, 44, 50).

L'émergence des souches du groupe O ne va pas sans poser un certain nombre de problèmes:

- Tout d'abord leur éloignement génétique par rapport aux autres souches rend plus ardues les travaux sur le vaccin contre le SIDA.

- Sur le plan des tests de dépistage, les virus du groupe O sont insensibles à certains tests rapides de dépistage et à certains tests immunoenzymatiques (Elisa) (10, 32). De plus ils présentent au Western blot des bandes incomplètes et atypiques sur lesquelles la glycoprotéine (gp 120) et la forme monomérique de la glycoprotéine transmembranaire (gp41) sont absentes ou apparaissent faiblement (20, 32). Cette situation est capable d'occasionner des erreurs d'interprétation très graves dans les centres hospitaliers et les services de transfusion sanguine d'un pays comme le Mali où les tests rapides, l'Elisa et le Western blot sont très utilisés pour le dépistage et la confirmation des sérums VIH positifs.

Notre étude se propose de rechercher le groupe O du VIH-1 dans des sérums recueillis chez des personnes résidant dans toutes les régions du Mali et de déterminer sa prévalence au sein de la population des VIH-1.

Au cours de cette étude, nous décrirons le génome du VIH-1 ainsi que quelques particularités des sous-types Env VIH-1 A à I, puis nous exposerons notre méthodologie et nos résultats.

## **GENERALITES**

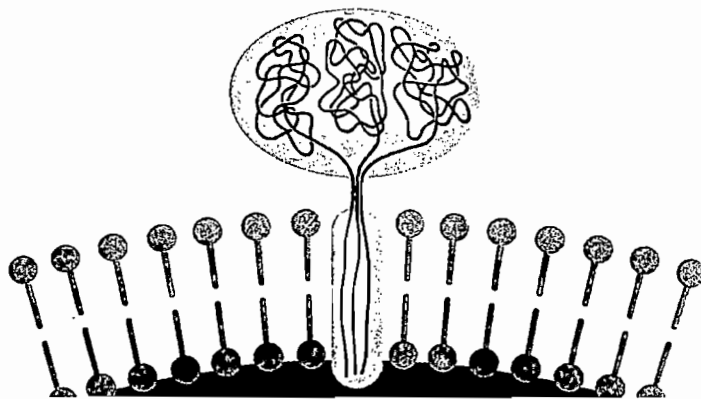
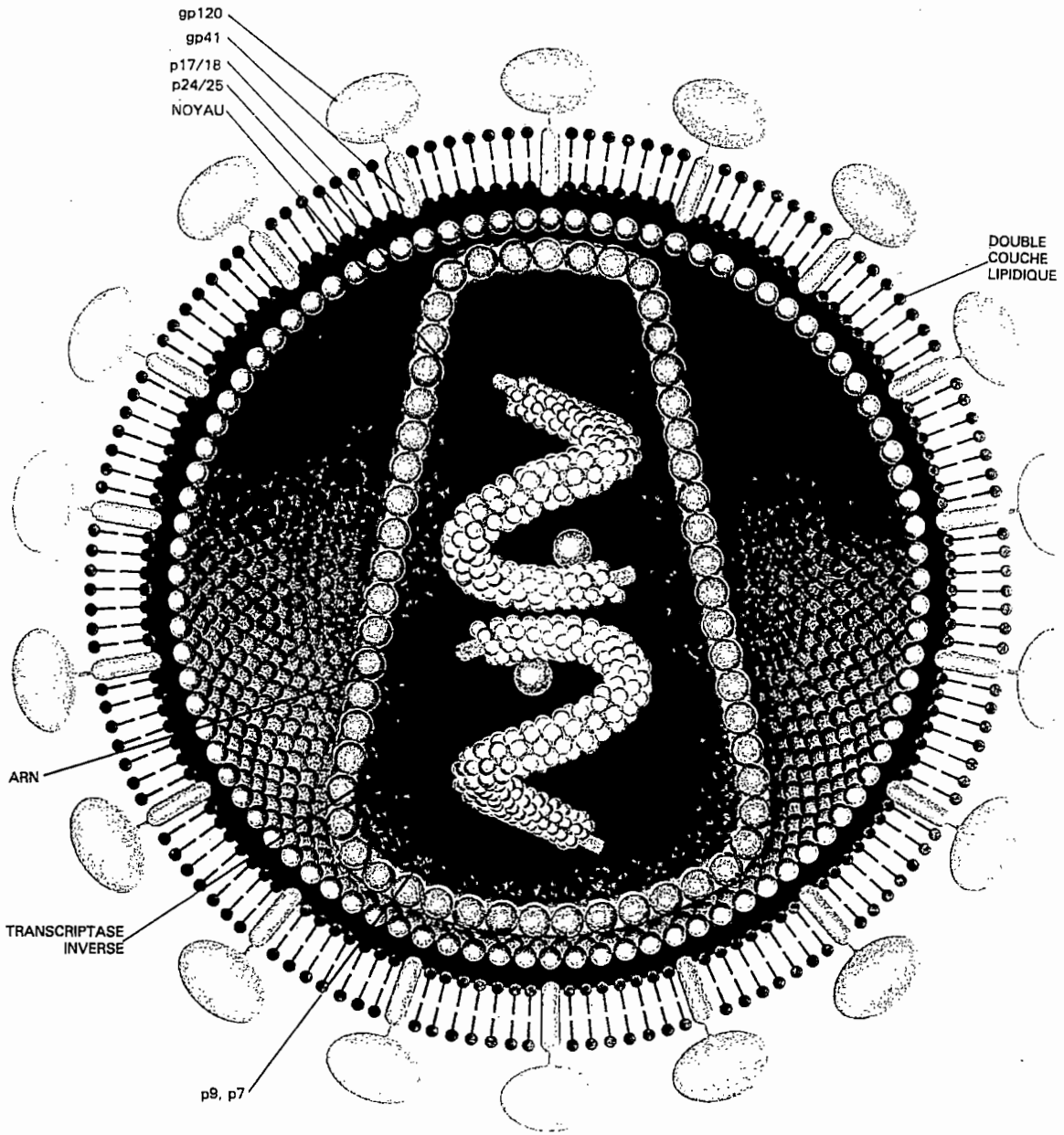
Des deux virus responsables de l'immunodéficience humaine, le VIH-1 est le plus étudié. Les virus du SIDA appartiennent à la famille des rétroviridae et à la sous-famille des lentiviridae (14). Le VIH est responsable d'une infection lente qui se caractérise par une chute du taux des lymphocytes CD4 dans le sang et dont la conséquence est l'apparition d'infections opportunistes et de cancers (51).

D'une façon générale tous les lentivirus ont la même organisation génomique. Le génome du VIH se compose de trois gènes de structure et de plusieurs gènes de régulation (14, 38).

### **A\ Rappels sur l'organisation génomique du VIH.**

#### **1-Morphologie:**

Le VIH est un virus enveloppé qui se présente sous forme d'une petite boule de 80 à 120nm de diamètre (14) avec à l'intérieur, le noyau se présentant soit sous forme sphérique excentré, soit sous forme de trapèze (14, 51). De l'enveloppe lipidique émergent des boutons qui ont une longueur de 9-10nm au-dessus de la couche lipidique et une largeur voisine de 14nm au niveau de la tête (14, 39, 51) illustration (n°1).



## 2- Organisation génomique:

### 2-1 Les gènes de structure

Ils sont présents dans la particule virale et dans la cellule infectée. Ce sont les gènes Gag , Pol et Env.

#### a- Le gène Gag

Il code pour une polyprotéine (précurseur) de 55 kilodaltons (kd) (4). Cette dernière est par la suite clivée par une protéase virale en 3 protéines consécutives qui forment la nucléocapside.

Ce sont les protéines:

P 17/ P18-nucléocapside N terminale

P24/P25 protéine majeure

P13/15 nucléocapside C terminale cette dernière est clivée en protéines P6 et P9 (7, 14,28). Ces protéines sont très conservées d'une souche à l'autre. Il existe une homologie non négligeable (58%) entre les protéines Gag de VIH-1 et celles de VIH-2. Ceci explique les réactions sérologiques croisées observées lors de la détection des anticorps dirigés contre les protéines internes de ces deux virus (7, 38).

#### b- Le gène Pol

Ce gène code pour trois protéines chacune associée à une activité enzymatique (14, 38).

Ces enzymes sont respectivement de l'extrémité N terminale à l'extrémité C terminale:

##### i- La Protéase

Protéine de 12000 daltons (7) . Elle intervient pendant la phase de maturation du virion. Elle coupe le précurseur polyprotéique Gag-Pol ainsi que toutes les protéines intermédiaires pendant la phase de maturation (14, 38).

##### ii- La Transcriptase inverse

C'est une protéine enzymatique constituée de deux sous-unités, une de 66000 daltons et l'autre de 51000 daltons (14). Cette enzyme est responsable de la rétrotranscription, c'est une ADN polymérase ARN dépendante qui copie l'ARN viral en un ADN complémentaire. Comme toutes les ADN polymérases, elle a besoin d'une amorce qui s'attache à l'extrémité 5' de l'ARN viral afin de démarrer la polymérisation (38). La transcriptase inverse du virus VIH utilise comme amorce

l'ARN de transfert de la lysine (tARN-Lys) qui s'apparie sur 16 nucléotides à l'extrémité 5' de l'ARM viral. Une fois le brin d'ADN formé l'enzyme dégrade le brin d'ARN original grâce à son activité RNase H et polymérise l'ADN simple brin en un ADN double brin. Contrairement aux ADN polymérase ADN dépendantes (ADN polymérase cellulaires), il n'existe pas de système de correction en cas d'erreur de polymérisation (38, 60).

### iii- L'Endonucléase ou intégrase

C'est une protéine de 34.000 daltons à (4, 51) qui intervient lors de l'intégration de l'ADN viral dans le chromosome de la cellule hôte (7, 63). Son mécanisme d'action est mal connu contrairement à d'autres rétrovirus, l'ADN du virus VIH s'intègre au hasard dans l'ADN cellulaire et l'on ne connaît pas de sites préférentiels d'intégration.

#### c- Le gène Env

Il est remarquable par sa grande capacité codante (environ 850 acides aminés) (7, 38). Ce gène s'exprime par un ARNm sous-génomique de 42kd traduit en un précurseur de 160kd (7, 38). Ce précurseur est clivé par une protéase cellulaire au niveau du site riche en acides aminés basiques pour donner la glycoprotéine externe gp120 N terminale et la glycoprotéine trans-membranaire gp41 C terminale et ancrée à la membrane par une région très hydrophobe (33). Les deux glycoprotéines sont associées de façon non covalente (38). Le gène Env est celui qui présente le maximum de variabilité notamment au niveau de la gp120, le taux de variation pouvant atteindre 50% entre différentes souches de VIH-1 (37, 39, 44). De plus la variabilité n'est pas répartie de façon homogène tout au long de la gp120, il existe des régions hypervariables espacées par des séquences relativement plus conservées (33). La gp120 est responsable au moins en partie des propriétés cytopathogènes du virus. C'est grâce à sa glycoprotéine externe que le virus se fixe sur la molécule CD4 de la cellule cible (33, 38).

### **2-2- Les gènes de régulation**

Ils sont au moins au nombre de cinq, ils s'expriment pendant la réplication intra-cellulaire du virus en codant pour les protéines qui vont moduler la multiplication virale (7). Ce sont les gènes Tat, Rev, Nef, Vif présents chez VIH-1 et VIH-2. Deux autres gènes Vpu et Vpx sont présents respectivement chez VIH-1 et VIH-2 (14, 38, 39).

### 2-2-1- Les gènes transactivateurs:

On appelle gène transactivateur un gène capable d'activer d'autres gènes situés à distance sur une autre molécule. Les virus VIH en possèdent deux: les gènes Tat et Rev.

#### a- Le gène Tat (trans-activateur)

Il est codé par les ARNm les plus précoces du virus (28), c'est un gène constitué de deux hexons codants. Il code pour une protéine de 14000 daltons indispensables à la réplication virale. En effet, des virus mutés dans le gène Tat sont incapables de se répliquer (14, 38, 63). La protéine tat favorise l'expression du provirus intégré et ceci à deux niveaux.

- Au niveau transcriptionnel: elle se fixe sur la LTR ( Long Terminal Repeat) au niveau d'une région dénommée TAR. La conséquence en est une activation de la transcription de l'ADN proviral en ARN.

- Au niveau post-transcriptionnel: elle se fixe à l'extrémité 5' des ARN messagers viraux. Cette fixation est indispensable pour une traduction efficace des ARN messagers en protéine (38). En effet l'extrémité 5' des ARN viraux présente une boucle qu'inhibe la traductibilité de ces ARN, mais la fixation de la protéine Tat sur la boucle lève cette inhibition (63). Le gène Tat permet donc une augmentation du taux d'ARN viraux traductibles dans la cellule infectée.

#### b- Le gène Rev (regulator of virion protein)

C'est un gène constitué de deux hexons codants éloignés (14). Il code pour une protéine de 19000 daltons qui a une localisation nucléaire. En absence de celle-ci le virus ne peut synthétiser que des protéines de régulation mais pas de protéine de structure. En effet la protéine rev se fixe sur les ARN messagers de grande taille au niveau d'une séquence spécifique: la séquence Car. L'interaction entre Car et la protéine lève l'inhibition des séquences CRS et permet donc la traduction des ARN de grande taille en protéine de structure (14, 39).

### 2-2-2- Les autres gènes régulateurs:

#### a- Le gène Vif: (Virion infectivity factor)

Ce gène code pour une protéine de 23000 daltons, il permet d'augmenter l'infectivité du virus (7, 38, 51). Les virus mutés dans ce gène sont toujours capables de se multiplier mais ils ne peuvent plus infecter les lymphocytes par contact de type virus-cellule. Par contre, l'infectivité cellule infectée à cellule saine reste possible (7, 38).

b- Le gène Nef (negative factor)

Ce gène code pour une protéine de 27000 daltons qui est myristillée. Il s'agit d'un gène de régulation négative. Si le virus est muté dans ce gène Nef, il se réplique plus vite et mieux (7, 38). La protéine nef ralentit l'expansion virale en interrégissant, probablement grâce à un intermédiaire, avec une région de la LTR virale dénommée NRE (Negative Regulator Element) (38).

c- Le gène VPU:

Ce gène n'est présent que dans le génome du VIH-1. Les virus mutés à ce gène perdent la propriété d'assemblage au moment du bourgeonnement à la fin du cycle viral. Des cellules infectées par ces mutants présentent une forte accumulation des protéines virales intracellulaires sans production virale (7).

d- Le gène VPR

C'est un cadre de lecture ouvert présent à la fois sur le génome du VIH-1 et sur celui du VIH-2. Ce gène semble très conservé d'une souche à l'autre mais aucun rôle n'a pu lui être attribué (38, 51).

## **B/ Variabilité du VIH -1 et structure de la boucle V3**

### **I/ Variabilité du VIH-1**

L'analyse des séquences nucléotidiques des clones moléculaires du VIH-1 a permis d'identifier tout au long du génome viral, des zones conservées et des régions variables. Celles-ci sont principalement localisées dans le gène codant pour les protéines d'enveloppe et Nef, tandis que les gènes codants pour les protéines du core (Gag) et la transcriptase inverse (Pol) sont relativement plus conservés (5, 39, 48).

De nombreuses mutations sont observées tout au long du génome viral (39, 48, ). Elles sont ponctuelles, spécifiques, extensives et monotones de type Purine → Purine sur les gènes Gag et Pol (23, 48). Dans ce type de mutation la Guanine est mutée en Adénine, G → A (23).

Ces mutations extensives et monotones au sein d'une même séquence ont été dénommées hypermutations (23). Des données statistiques ont établi un ordre préférentiel de substitution G → A comme suit: GpA > GpG > GpT > GpC. Elles se dérouleraient pendant la synthèse de l'ADN<sup>(-)</sup> (15, 23).

Sur le gène Env, en plus des mutations qui affectent l'ensemble du génome, des délétions, des insertions en phase et des duplications se manifestent (23, 32, 48). Elles se traduisent par la grande hétérogénéité des protéines codées par ce gène.

Le mode d'expression des mutations n'est pas le même dans tous les gènes. En effet 50% des délétions et des insertions sont exprimées alors que la plupart des mutations ponctuelles affectant Gag et Pol restent silencieuses (48).

Deux phénomènes expliqueraient ces grands changements dans le génome du virus au cours de son cycle de multiplication. Premièrement sont impliquées les caractéristiques propres des enzymes de réplication. Le VIH-1 est extrêmement dépendant de l'activité des ANR polymérase, enzyme réputées pour entraîner un taux d'erreur élevé de l'ordre de  $10^{-3}$  à  $10^{-4}$  par cycle et ne disposant pas de système enzymatique exonucléasique de correction (23, 48). Deuxièmement, sont incriminés, des mécanismes liés à la diploïdie du génome viral. Car, au cours de la synthèse du premier brin d'ADN complémentaire, la transcriptase inverse saute d'un brin d'ADN à l'autre, notamment lorsqu'elle rencontre une coupure ou une structure secondaire stable, générant ainsi insertions et délétions (32).

### I-1- Variabilité et Tropisme

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) infecte les lymphocytes et les macrophages exprimant à leur surface une glycoprotéine de 55000 daltons: CD4 (14, 33). Un deuxième récepteur a été identifié sur deux types de cellules: les oligodendrocytes du cerveau et les cellules épithéliales. Il s'agit d'un glycosphingolipide: le galactosyl céramide (19). Le tropisme ou l'infectivité du VIH vis à vis d'une lignée cellulaire n'est pas seulement dépendant de la seule présence de ces deux récepteurs. Il est aussi fonction de la nature même de la gp120 et varie en même temps que varie certaines séquences de la gp120 (23, 61). En effet les souches tropiques pour les macrophages présentent une séquence de 94 acides aminés, englobant la boucle V3 entre les acides aminés 240 et 333, qui détermine le tropisme du virus pour les macrophages. Cette séquence lorsqu'elle est transférée sur des souches non tropiques pour les macrophages leur confère cette propriété (45, 46). De plus des substitutions au niveau de la boucle V3 sont suffisantes pour changer le tropisme. Un minimum de trois substitutions sur la boucle V3 peut conférer au virus muté un tropisme pour les macrophages et diminuer celui des lymphocytes T (56). La substitution par le tryptophane à la position 432 peut annuler la liaison au CD4 et rendre le virus ainsi muté non infectieux (2, 58). Par contre la substitution par un autre acide aminé à cette position n'affecte pas la liaison au CD4 mais réduit le tropisme (2, 46).



### I-2- Variabilité et caractères biologiques

La culture des isolats viraux dans les monocytes du sang périphérique et dans les lignées cellulaires tel que MT-2 all, Hut-78, Jurkat, C8166, a permis de dégager certains caractères biologiques des souches virales. Ces caractères sont: répliation rapide ou lente en terme de temps, taux élevé ou bas de répliation, capacité d'induire ou non des syncytia. Les bases génétiques du caractère inducteur de syncytia ont été établies; ce caractère dépend de la charge électrique de la boucle V3 qui elle même est fonction de la charge des acides aminés des positions 11 et 25 de la boucle V3. Lorsque les acides aminés de ces deux positions ont une charge électrique positive élevée, la boucle V3 a une charge positive et le virus est potentiellement capable d'induire des syncytia (16).

### I-3- Variabilité intra-individuelle au cours de l'infection:

Dès sa pénétration dans l'organisme, le virus est soumis à une pression constante du système immunitaire. Varier c'est à dire changer la manière dont il se présente à l'hôte est pour lui un bon moyen d'échapper aux défenses de l'organisme (48, 59). Des études ont montré que la distribution des mutations dans le génome ne résulterait pas du simple hasard mais serait en rapport avec une pression de selection positive du système immunitaire (32). Les régions hypervariables c'est à dire celles les plus soumises aux mutations ont été identifiées comme les déterminants de l'antigénicité virale (42, 48, 59). Parce qu'il est en perpétuelle fluctuation, le VIH donne au fil du temps plusieurs lignées virales différentes, sans grand rapport avec le virus infectant. TOM et al (59), ont étudié sur une période de cinq ans, chez deux séropositifs, l'évolution des séquences consensuelles des isolats recueillis chez ces derniers. Ils ont constaté une variation progressive dans le temps des différentes séquences par rapport aux séquences initiales. Les premières séquences et les dernières présentaient une distance de 13%.

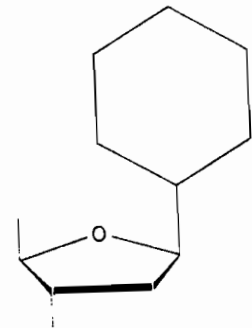
Pris individuellement un patient n'est pas infecté par un virus mais par plusieurs variants génotypiques du même virus (32).

### I-4- Variabilité et résistance aux antiviraux:

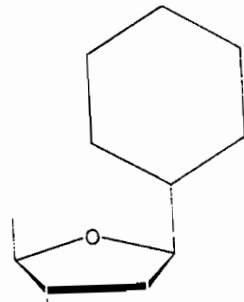
#### 1- Les antirétroviraux et leur mécanisme

L'arsenal thérapeutique antirétroviral actuellement sur le marché est composé d'une seule classe thérapeutique: la classe des inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (32). Ce sont la 3'- azido- 2'-3'- didéoxythymidine (zidovudine AZT), la 2'-3' didésoxyadénosine (dda), la

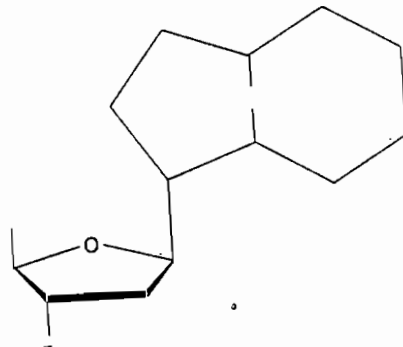
2'-3' du didésoxycytosine (ddc). Ces trois molécules agissent après phosphorylation en inhibant spécifiquement la transcriptase inverse par un phénomène de compétition sur les substrats habituels de l'enzyme et par blocage de l'élongation (32, 53) (voir illustration n°2 et 3).



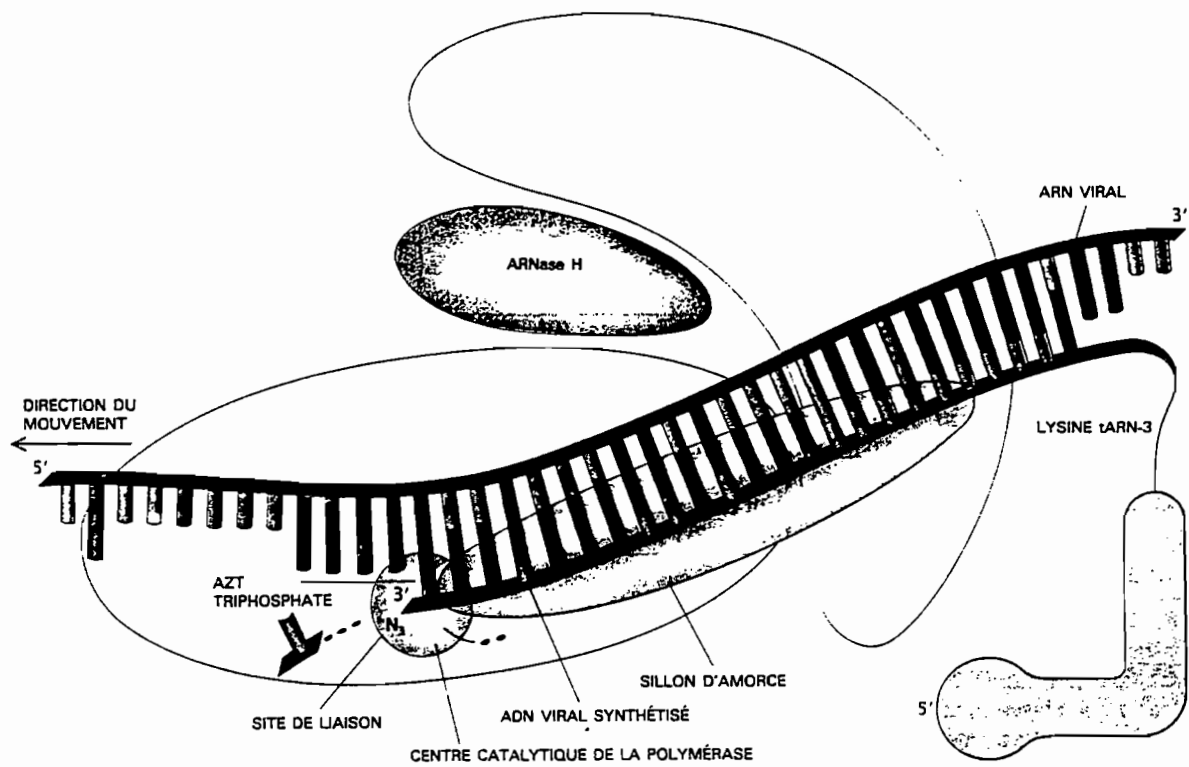
3' -AZIDO-2', 3'-  
DIDÉSOXYTHYMIDINE (AZT)



2', 3' -DIDÉSOXYCYTIDINE (ddC)



2', 3' -DIDÉSOXYADÉNOSINE (ddA)



Ullustration n°3: MECANISME D'ACTION DE L'AZT D'APRES ROBERT Y coll (52)

l'AZT triphosphate (en rouge) bloque l'ADN viral en empêchant à tout autre nucléotide supplémentaire de se fixer.

## 2- Variabilité: conséquence des antirétroviraux sur le génome du VIH

Des phénomènes de résistance sont apparus après l'administration (généralement 6-9 mois) de Zidovudine (53). Il a été noté que les souches résistantes devenaient 10 à 100 fois moins sensibles à l'antiviral que celles sensibles (11).

L'étude d'un fragment de 618 paires de bases du gène de la reverse transcriptase a permis de jeter certaines bases génétiques du phénotype résistant (11). L'émergence du phénotype résistant fait suite à l'apparition des modifications qui interviennent sur la structure même du gène Pol. Ainsi pour la Zidovudine l'apparition du phénotype résistant est précédé de cinq mutations sur les codons 41, 67, 70, 215, 219 (32, 42). Le type de mutation conditionnerait le niveau de résistance. Les mutations sur les codons 70, 215 seules ou en combinaisons sont à l'origine d'un phénotype intermédiaire. Quatre mutations sont nécessaires sur les codons 67, 70, 215, 41 ou 219 pour l'apparition du phénotype très résistant (32). Ces mutations se traduisent sur la protéine par les substitutions suivantes: Asp67  $\rightarrow$  Asn; Lys70  $\rightarrow$  Arg; Thr215  $\rightarrow$  Phe ou Tyr et Lys219  $\rightarrow$  Gln (11).

Avec la didanosine les phénotypes résistants s'accompagnent des mutations sur les codons 74, 125, 184. Pour la Zalcitabine, ce sont les codons 65, 69, 184 qui sont impliqués (21, 32). Les changements intervenus sur le génome ont des conséquences sur les caractères biologiques des souches concernées. En effet, les souches résistantes sont apparues moins infectieuses mais plus pathogènes que leurs homologues sensibles; elles connaissent plus de difficultés à infecter une cellule mais une fois infectée la cellule sera détruite beaucoup plus rapidement que lorsqu'elle est infectée par une souche sensible (53).

## **II/ Structure et fonctions de la boucle V3**

### II-1- Structure

La Gp120 présente cinq régions conservées C1-C5 qui alternent avec cinq régions hypervariables V1-V5 (18, 26, 32). La troisième V3 est un fragment de 32-35 acides aminés encadrés par deux cystéines (26), lesquelles se lient entre elles par un pont disulfure occasionnant le repliement de la chaîne sur elle-même en forme de boucle ce qui explique le nom de boucle V3 donnée à cette région. (Voir illustration n°4).

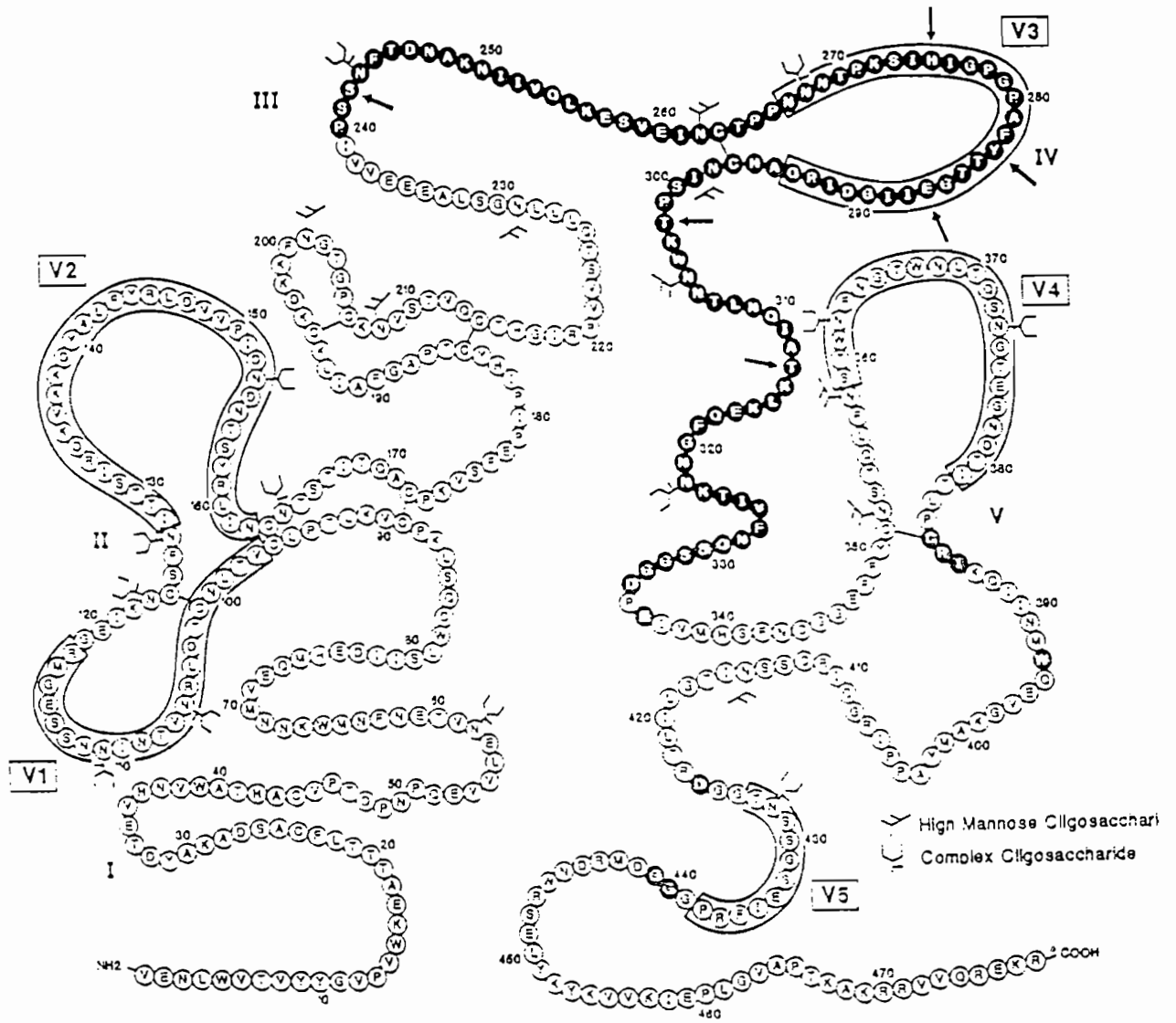
Bien qu'étant l'une des régions les plus variables de la gp120, la boucle V3 présente néanmoins quelques zones relativement bien conservées. En effet les zones situées de part et d'autre

du pont disulfure et le site Asp glycosylable situé près de l'extrémité amino-terminale de la boucle sont conservés chez la plupart des isolats (33). La séquence GPGR présente au niveau du pic de la boucle est bien conservée chez la plupart des isolats américains et européens. Chez les isolats africains c'est la succession GLGQ qui est fréquente (36).

De nombreuses études ont été entreprises pour déterminer la configuration tridimensionnelle de la boucle. Elles se sont toutes soldées par des échecs. Cependant, des prédictions ont été faites à l'ordinateur sur cette structure, à partir des informations et des propriétés physicochimiques des différents acides aminés présents sur les séquences consensuelles de certains isolats. Deux modèles ont été retenus, le premier présente la boucle V3 comme formée de deux structures qui coexistent: une structure  $\beta$  dans la majeure partie de sa séquence aminée et une structure  $\alpha$  hélice à l'extrémité carboxylique (33). Le second modèle présente la chaîne aminée de la V3 pliée en deux feuillets, l'un stable et l'autre variable et liés en  $\beta$  au niveau du pic de la boucle (33).

### II-2- Rôle et fonctions de la boucle V3

La boucle V3 est très antigénique, elle est considérée comme l'épitope principal de neutralisation du virus. En effet c'est la cible des premières cellules immunitaires dirigées contre le virus telles que les lymphocytes T helper, T cytotoxiques, les lymphocytes  $\beta$  ainsi que des anticorps dépendant du complément (33). Elle joue un rôle dans l'infectivité du virus, elle intervient notamment dans le tropisme virus vers la cellule, dans la fixation à la molécule de CD4, dans la fusion virus - cellule ainsi que dans la formation des syncytia (31, 40). A cause de ces multiples fonctions la boucle V3 est très étudiée, elle serait la cible éventuelle des vaccins dirigés contre le virus (31).



Ullustration n°5: STRUCTURE PRIMAIRE DE LA GP120 D'APRES P. WESTERVELT coll  
(45)

## C/ PRINCIPES DES METHODES DE TYPAGE DES VIH

### Principe général

Le sang total est recueilli dans des tubes à essai en présence d'anticoagulant (héparine). Les lymphocytes sont isolés sur gradient de densité ficoll hypaque. Puis ils peuvent être soit lysés directement soit mis en culture en présence de lymphocytes de sujets séronégatifs. La culture est déclarée positive par la détection au bout de trois semaines de transcriptase inverse ou d'antigène p24. Le DNA est extrait des cellules cultivées par le mélange phénol-chloroforme et précipité par l'éthanol puis quantifiée par spectrophotométrie. Le DNA est ensuite amplifiée par la PCR en utilisant des primers conventionnels pour les souches virales du groupe M et des primers Env5 - Cam (5' GACTCG AGT (R) GTT ACT TGT ACA CAT GGC AT-3') Env3 - Cam (5'- GAG AATTCACAATAA AAGAACTCC ATG ACAGT-3') pour la région Env et Gag-5- Cam (5'- GACTCG AGC AGG GAC AAATGG TACATCA-3') gag3-Cam (5'- GAG AATTCA GTA GCTTGCTCA GCT CTT AAT-3') pour les souches du groupe O (25). Les fragments amplifiés d'un même clone sont séquencés et les séquences consensuelles sont dégagées pour définir les souches, les sous-types. Cette étape de séquençage est laborieuse et nécessite des équipements performants (40).

ERI Delwatt et al (13) ont mis au point l'Heteroduplex Mobility Assay (HMA) pour contourner cette étape de séquençage. Ici les fragments d'ADN d'une souche connue sont mélangés avec ceux de la souche inconnue. L'ensemble est dénaturé par la chaleur puis renaturé par refroidissement rapide dans de la glace. Il se forme de nouveaux fragments d'ADN hétérogènes composés d'un brin provenant de la souche connue et l'autre provenant de la souche inconnue. Si les deux ADN diffèrent de plus 1-2%, la migration du duplex hétérogène sera plus lente que celle du duplex homogène. Lorsqu'on compare sur gel de polyacrilamide la migration électrophorétique de la DNA homogène de la souche connue à celle du DNA hétérogène, il s'en suit une différence de migration qui est proportionnelle à la distance génétique; celle-ci est déterminée par le nombre de délétions, d'insertions ou de mutations.

### **Ia- Exemple: Protocole de l'extraction de l' ADN**

#### **1 Isolement des lymphocytes:**

Le sang (5-10ml) prélevé stérilement sous anticoagulant (héparine) est laissé à température ambiante pendant environ une heure, puis il est dilué sous hotte, avec PBS (vol/vol). Dans un tube

stérile de 50 ml verser 12 ml de Ficoll (hypaque-Pharmacia) et déposer dessus très délicatement le sang dilué de façon à ne pas le mélanger avec le ficoll. Centrifuger la suspension sang+ficoll pendant 20 à 30mn à 1800g (environ 2000 rpm) à température ambiante. Le ficoll a pour propriété de séparer par gradient de densité les hématies (plus denses) des cellules blanches (monocytes, lymphocytes) et plaquettes. Schématiquement on récupère après centrifugation: 1° les hématies au fond du tube, 2° mélanger à la suspension de ficoll des monocytes -macrophages, puis 3° au niveau d'un anneau blanchâtre assez opaque, les cellules lymphocytaires et quelques monocytes, et au dessus enfin, 4° les plaquettes et 5° le serum dilué. Le gradient de cellules ainsi formé est très fragile et nécessite beaucoup de prudence pour ne pas le rompre.

Après avoir retiré le serum, pipéter doucement la couronne lymphocytaire en effleurant sa surface avec une pipette et en parcourant la circonférence du tube. On aspire environ 4-7 ml. Les lymphocytes récupérés sont alors lavés dans PBS stérile (vol/vol) centrifugés 2000 rpm 5mn pour évacuer les traces de ficoll. Le culot lymphocytaire est resuspendu dans 10 ml PBS stérile (un aliquot 100 µl peut être prélevé stérilement pour effectuer une numération) puis centrifugé 5mn à 1000 rpm maximum. Le culot final est repris soit dans milieu de culture (ajuster le volume pour avoir  $10^6$  cell/ml) soit par une solution de NTE ajustée  $5 \cdot 10^6$  cell/ml si on envisage l'extraction immédiat de l'ADN.

## **2- Lyse des lymphocytes et extraction de l'ADN génomique.**

### **a- Lyse des lymphocytes:**

Après avoir resuspendu le culot de lymphocytes, ajouter de la solution de sarcosyl 10% afin d'avoir une concentration finale de 1%. Le sarcosyl étant un agent lytique, on constate la lyse des cellules par une augmentation sensible de la viscosité et de la transparence de la suspension cellulaire.

### Traitement à la RNase et à la protéinase K

La concentration de la solution stock de RNase A est de 10mg/ml. L'enzyme est ajouté afin d'avoir une concentration finale de 50µg/ml. On laisse agir l'enzyme de 30 à 60 mn à température ambiante.

La protéinase K est stockée à 20mg/ml. La concentration finale utilisée est de 300µl/ ml. Les tubes sont incubés à 56°C au bain marie pendant une heure ou toute une nuit à 42°C.

### **b- Extraction de l'ADN au phénol-chloroforme (Sevag):**



Les protéines dégradées au stade d'acides aminés ou de peptides par la protéolyse par la protéinase K sont solubilisées dans le phénol, qui n'est pas miscible à l'eau. La phase aqueuse s'en retrouve alors dépourvue. Les traces de phénol résiduelles dans la phase aqueuse sont à leur tour dissoutes dans le sevag. L'extraction s'effectue en deux étapes.

Etape 1: Extraction « phénol »

- Mélanger un volume de phénol avec un volume de lysat, agiter 15 minutes à la température du laboratoire, et centrifuger 10mn à 8000 rpm récupérer la phase aqueuse supérieure (contient l'ADN) à l'aide d'une « liquipipette ».

Etape2: Extraction au sevag

- Mélanger un volume de sevag avec un volume de phase aqueuse précédente, agiter 15 minutes à la température du laboratoire, et centrifuger 10 minutes à 8000 rpm récupérer la phase aqueuse supérieure.

**3- Précipitation de l'ADN:**

Pour un volume d'ADN, ajouter 1/20ème de volume NaCl 5M (NaCl final 0,25M) puis 2,5 volumes éthanol à -20°C homogénéiser la suspension. Travailler dans la glace.

Mettre les tubes à -80°C pendant 30mn. Centrifuger ensuite à 10.000 rpm pendant 30mn ou 15.000 rpm pendant 20mn. Eliminer l'éthanol+NaCl en retournant le tube après avoir vérifié que le culot (meduse) est bien collé, sinon pipeter le surnageant. Ajouter 1 volume d'éthanol à 80% pour laver le culot. Mettre dans la glace 5 à 10 mn centrifuger 15 mn à 15000 RPM.

Afin de ne pas perdre le culot éliminer le surnageant à l'aide d'une seringue. Laisser évaporer totalement l'alcool. Reprendre le culot dans de l'eau « commerciale » ou du tampon TE (tris 10mM Ph 7,6 EDTA 1mM).

**4- Détermination de la concentration en acides nucléiques:**

a- Evaluation de la pureté de l'ADN et de sa concentration par densité optique:

Il faut que l'ADN soit totalement resuspendu pour déterminer sa concentration. La pureté et la concentration de l'ADN sont déterminés par spectrophotométrie UV. L'ADN absorbe à 260nm. Les protéines à 280nm et en partie à 260 nm et le phénol à 230 nm. La densité lue à 260 nm permet de calculer la concentration de l'ADN.

1 unité de DO à 260 nm correspond à 50µg/ml d'ADN.

Le rapport DO 260/DO 280 indique la présence de protéines. Il doit se trouver entre 1,8 et 2.  
Pour la détermination de la densité optique, réaliser une dilution au 1/20 de l'ADN dans l'eau.

**b- Déterminer la concentration de l'ADN par migration sur gel:**

Déposer sur gel d'agarose, une fraction de l'ADN à doser (1 à 10 $\mu$ l) et dans les puits voisins une gamme d'ADN de concentration connue (généralement de l'ADN de marqueur de taille). Le dosage en ADN de l'échantillon se fait en comparant la luminescence de cet échantillon avec l'ADN de référence. Exprimer la concentration en  $\mu$ g/ $\mu$ l.

**I-b-Principe et méthode de la technique d'amplification génique (PCR)**

**1-Définition et Principe:**

La polymérase chain reaction (PCR) est une technique de diagnostic très sensible qui permet de détecter la présence d'un faible nombre de séquences virales dans l'ADN de cellules infectées. En théorie, cette technique permet aisément la détection d'une seule copie de la séquence virale parmi un million de cellules non infectées.

La PCR est basée sur la réplication enzymatique d'un fragment d'ADN par un enzyme la Taq polymérase. La succession des réactions de réplication de l'ADN simultanément sur les deux brins (sens et antisens) conduit à accroître, selon une progression exponentielle, le nombre de copies.

**2- Réaction:**

L'amplification enzymatique de régions génomiques se fait en trois étapes.

i- Dénaturation de l'échantillon d'ADN (sous forme de simple brin) à 92°C.  
Réduction de température.

ii- Hybridation avec amorces oligo-nucleotidiques (primers) situés de part et d'autre du fragment à amplifier, chaque nucléotide étant complémentaire à un des deux brins. L'hybridation des primers sur la molécule d'ADN matrice dépend d'une combinaison liant la température (TM), la séquence et la longueur du primer.

iii- Polymérisation (élongation) après l'amorçage de l'élongation. La Taq-polymérase parcourt la matrice ADN dans le sens 5' ---> 3' en la recopiant par complémentarité. Ainsi au terme d'un cycle PCR le nombre de matrice d'ADN a doublé. Finalement chaque nouveau brin issu d'une réaction d'élongation devient au cycle suivant une matrice supplémentaire à partir de laquelle une

nouvelle copie pourra être synthétisée. L'amplification devient donc exponentielle car le nombre de matrices disponibles double à chaque cycle. Ainsi, à partir d'une molécule on obtient théoriquement:

si on fait 10 cycles  $2^{10}$  molécules

20 cycles  $2^{20}$  molécules

soit une relation: n cycles:  $2^n$  molécules.

## **II- Typage à grande échelle: technique des tests immuno-enzymatiques utilisant des protéines recombinées ou synthétiques:**

### **Principe:**

Cette méthode repose sur le principe de l'immunoblot sur bandelette de nylon. Les séquences consensuelles des peptides viraux (V3 ou C3-V3) obtenues par PCR sont multipliées par la technique de recombinaison dans *Escherichia Coli* ou tout simplement synthétisées. Elles sont transférées individuellement et en ligne sur des bandelettes de nylon. La mise en oeuvre de la technique immunoblot permet de déterminer les anticorps dirigés spécifiquement contre les V3 des souches fixées sur la bandelette. Ce qui permet d'enduire la souche, le sous-type ou le groupe des échantillons soumis au test.

## **D/ PHYLOGENIE DU GENE ENV**

L'étude du gène Env, ainsi que le séquençage de la chaîne aminée de l'enveloppe virale ont permis de dégager les séquences consensuelles de la boucle V3 et particulièrement du sommet de la boucle V3. Ces travaux ont également permis de calculer les distances génomiques entre différents virus et de les classer en souches, en sous-types et en groupes. Les distances génomiques sont de 5% à 20% entre les souches qui forment un même sous-type, 25% à 30% entre les sous-types, 50% et plus entre les groupes du VIH type 1 (18).

### **I- Le groupe M**

Il comprend les sous-types A à I. Ces sous-types présentent entre eux une distance génomique inférieure à 30% (18).

#### **1- Le sous-type A**

Il comprend quatre souches: la souche Z321 décrite au Zaïre, la souche D687 décrite au Ghana, la souche SF170 décrite au Rwanda, la souche U455 décrite en Ouganda (29).

La séquence consensuelle dégagée au sommet de la boucle V3 est KSVHIGPGQAFYAT (47).

### 2- Le sous-type B

Très répandu chez les sujets infectés en Europe et aux USA et dans plusieurs pays du Tiers-monde. La séquence consensuelle au sommet de la boucle V3 est KSIHIGPGRAFYT (9, 47). Il comprend les souches VIH1 MN, SF2 décrites aux Etats-Unis. La souche OYI décrite au Gabon, la souche LAI décrite en France, la souche RF décrite en Haïti (29). Certaines de ces souches ont été assez bien étudiées et leurs séquences aminés décrites.

VIH-1 MN CNKRKRIHIGIPGRAFYT  
 VIH-1 SF2 CNTRKSIYIYIGPGRAFHTTGR  
 VIH-1 HXB2 CNTRKRIRIQRGPGRAFVTI  
 VIH-1 RI CNTRKRITKGRVIYATGQ (31).

### 3- Le sous-type C

Décrit chez des patients Ethiopiens, sa présence a également été signalée en Afrique du Sud (souche-NOF), en Inde (souche D747) et au Brésil. La séquence consensuelle au sommet de la boucle V3 est KSIRIGPGQTFYAT (47).

### 4- Le sous-type D

Très répandu parmi les séropositifs Zaïrois (29). Présent également au Brésil (18), en Thaïlande (35). Il comprend les souches VIH-1 NDK, JVI, Z2Z6, Eli toutes décrites au Zaïre (29). La séquence consensuelle est RQRTHIGPGQALYT (47).

La séquence de VIH-1 Eli:

CNTRQRTPHIGLPQSLAFYT (53):

La séquence de VIH-1 Z2Z6:

CNTKQSTPHIGLPQSLAFYT (53).

Ces souches sont fortement syncytia inductrices, la charge électrique de la boucle V3 chez ces virus est élevée (16). La souche NDK a une pathogénicité très élevée (8).

### 5- Le sous-type E

Décrit au Rwanda, en Thaïlande. Il présente la séquence consensuelle DTSITIGPGQVFYRT (14).

### 6- Le sous-type F

Décrit chez des patients Camerounais, Roumains et Brésiliens. Il est marqué par une grande hétérogénéité entre les génomes. Au Cameroun trois génomes ont été décrits par Nkenganson et al (30) - Ca4, Ca16, Ca20- Ces génomes ont présenté entre eux une distance génomique de l'ordre de 13,02%. Les génomes isolés au Cameroun étaient très distants de ceux isolés en Roumanie et au Brésil, les distances génomiques étaient respectivement de 23,3% et 27%, alors que les génomes brésiliens et roumains étaient distants de 9,5% (30).

La séquence consensuelle de la boucle V3 du sous-type est IHLGPGQAFYAT (30).

#### 8- Le sous-type G

Décrit au Nigeria (1) et au Gabon (64). La séquence consensuelle au sommet de la boucle V3. IKFGTGRVLYATGAIT (64).

#### 7- Le sous-type H

Décrit par W. Janssens et al (64) à partir de deux génomes VIH-1 Ca13 - prélevé chez un patient camerounais - et VI557 - prélevé chez un patient zairois. C'est un sous-type nouveau peu étudié (44) la séquence consensuelle de la gp 120 à la V3 n'a pas encore été dégagée.

Séquence de Ca13 est: IGIGRQTFNA

Séquence de VI557 est: ISIGPGQAFYAT (64).

#### 9- Les sous type I:

Décrit récemment. Nous avons peu d'informations sur ce sous-type.

## II/ LE GROUPE O

### 1- Historique et généralités sur le groupe O

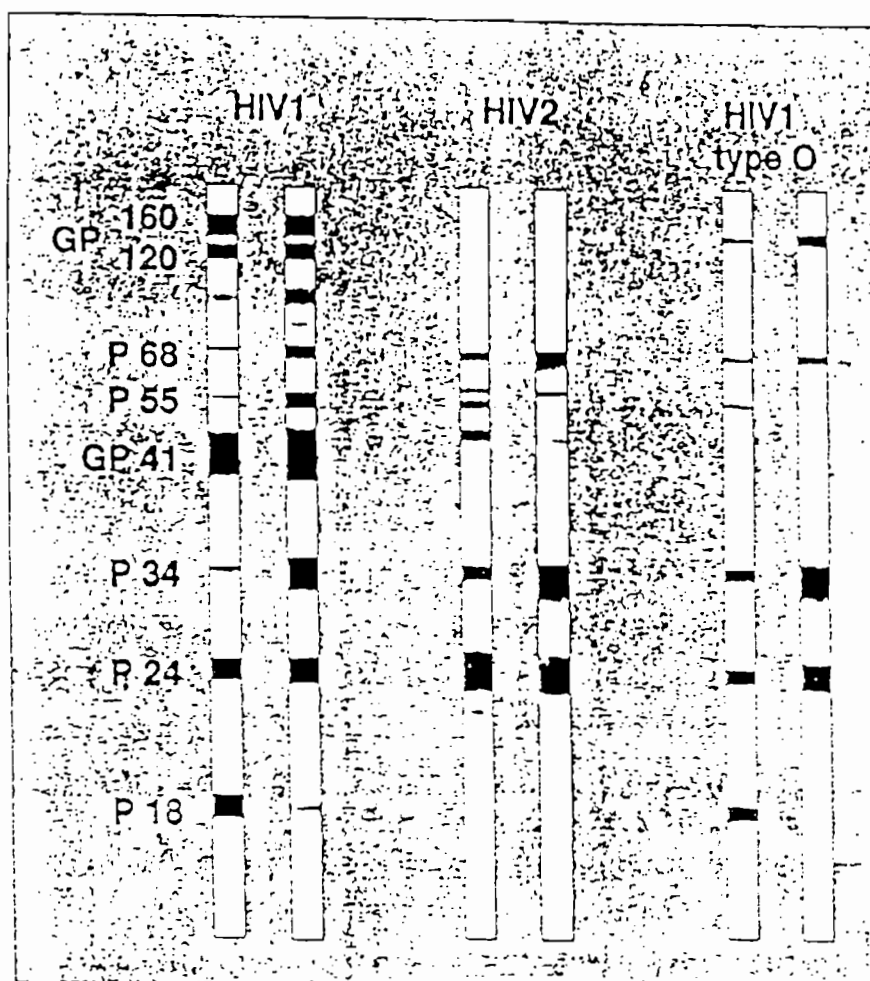
En 1987, un rétrovirus était isolé des lymphocytes d'une patiente asymptomatique d'origine camerounaise âgée de 19 ans (20) . La séquence complète de ce virus dénommé Ant70 était publiée en 1994 (39). La même année LUTZ G et coll (37), Pierre Charneau et coll (44) décrivaient deux virus proches de Ant70 et dénommés respectivement MVP5180 et Vau.

MVP5180 avait été isolé en 1991 d'un patient camerounais (20, 66) tandis que Vau provenait d'une française n'ayant jamais séjourné en Afrique (44).

Au Courant 1995 I. lousert-Ajaka et coll décrivaient sept nouvelles souches virales (BCF01, BCFO2, BCF03, BCF06, BCF07, BCFO8, BCF11) présentant les mêmes caractéristiques sérologiques que les trois précédentes. Ces dix souches forment ce qui est appelé le groupe O du VIH-1 (22, 25, 44).

En dehors des spécificités biologiques et génétiques propres à chaque souche, les souches virales du groupe O présentent un Western blot particulier (37) (voir illustration n°5).

La plupart des tests rapides sont négatifs ou tout au plus présentent une sensibilité limitée (14). L'amplification du DNA de ces souches n'est pas possible avec des primers VIH-1 groupe M (37). Sur le plan strictement pathogénie les souches O donnent chez les malades un tableau clinique identique à celui causé par les souches VIH-1 groupe M (39, 44, 50).



Ullustration n°5: Réaction comparée d'un VIH-1 groupe M, d'un VIH-1 groupe O , d'un VIH-2 sur des bandelettes de Western blod I d'Après SIMON, F. coll (20)

2- Variabilité au sein du groupe O: analyse d'un fragment de la P24 et de la région C2V3 de la gp120

Les souches du groupe O se définissent d'abord par leur éloignement génétique vis-à-vis de celles du groupe M, en moyenne 24,2% à 31,6% de distance sur le gène Gag et 38,9% à 49% de distance sur le gène Env (25). Ce degré d'éloignement et de variabilité se retrouve aussi au sein du groupe O même. En effet, les souches groupe O présentent entre elles 4,3% à 14,3% de distance sur Gag et 4,6 à 30,3% sur Env (25).

L'analyse d'un fragment de 133 acides aminés de la P24 révèle 25 variations au sein du groupe. On dénombre 13 positions sur lesquelles l'acide aminé substitué est remplacé par un autre présentant la charge et les caractéristiques biochimiques semblables. Deux genres de substitutions nucléotidiques apparaissent, suivant qu'elles ont un impact sur la séquence aminée ou pas; celles ne présentant aucun impact sur la séquence nucléotidique étant plus fréquentes.

Sur la région C2V3 des degrés d'hétérogénéité sont apparues, dont les plus marqués se retrouvent sur la boucle V3.

D'une manière générale la boucle V3 est formée de 32-35 acides aminés (26) chez les souches du groupe M. Chez les souches du groupe O, on peut dire que chaque souche est définie par le nombre des acides aminés qui composent sa boucle V3. Ainsi 36 acides aminés composent la boucle V3 de Ant70 et Vau, 37 celle de (BCFO2, BCFO1, BCFO7, BCF11) 38 celle (de BCFO6, BCFO8) et 39 celle de MVP5180. Seuls neuf acides aminés, les deux cystéines comprises, sont conservés dans la boucle V3 entre les souches O (25). Le pic de la boucle est caractérisé par un haut degré d'hétérogénéité. Tandis que le motif GLGQ est fréquent chez la majorité des isolats américains et européens (33), seul le motif GP est conservé sur les pics des boucles des souches O (110). Les différentes séquences rencontrées sont RIGPHAWY chez Vau et ant70, puis GIGPLSWY, GIGPMSVY, KIGPMAWY, KIGPLSWY, YTGPMRWR, ATGPLRWV, MAGPMAWY et GIGPLSWY (25, 39, 37, 44).

La gp 120 présente d'une façon générale 29 sites potentiellement N glycosylables, sept se retrouvent sur la région C2V3 (39, 44). Sur la C2, les 1er et 4ème sites sont bien conservés chez tous les isolats O et deux autres sont conservés chez huit des dix souches O (25). Le site 5 attelé à la première cystéine très conservé chez la plupart des isolats M, est absent chez les souches O. L'extrémité carboxylique de la V3 est une région très variable chez les isolats O. On y retrouve un site N glycosylable chez six des dix souches (25, 37, 44). Trois souches: BCFO6, BCFO7 et BCF11 n'ont pas de site potentiellement N glycosylable sur l'ensemble de la boucle V3, cependant avant la boucle toutes les souches en ont (25).

### 3- Particularités des souches du groupe O

#### 3-1- Particularités sérologiques d'une souche du groupe O: Exemple VIH-1 Vau

Différents Elisa ont été réalisés sur des échantillons de sérums prélevés chez la patiente infectée par VIH-1 Vau. Tous ces tests ont été positifs. Les Westerns blots réalisés avec des bandelettes sur lesquelles étaient fixés des antigènes VIH-1 ont donné une réactivité particulière. Les bandes de gp160 et gp120 sont apparues sous forme de traces tandis que les bandes correspondant aux produits des gènes Gag et Pol étaient fortement marquées. Sur les bandelettes de Western blot VIH-2 seule la bande correspondant à la protéine P26 est apparue (44).

#### 3-2- Particularités biologiques d'une souche du groupe O: Exemple VIH-1

##### MVP5180:

MVP5180 se cultive en présence de lymphocytes non contaminés stimulés par la phytohémagglutinine. Au bout de trois semaines le virus est mis en évidence par la présence de reverse transcriptase et la formation de cellules géantes: syncytia. MVP5180 s'adapte facilement et pousse en présence de lignée cellulaire T telles que HUT78, MT2, Jurkat et C8166 et sur la lignée monocyttaire U937. MVP5180 infecte donc les macrophages et les lymphocytes T. L'activité reverse transcriptase de MVP5180 est  $Mg^{2+}$  dépendante (37).

#### 3-3- Particularités structurales de l'enveloppe d'une souche du groupe O: Ant70

Le gène Env de Ant70 a une capacité codante de 863 acides aminés. La gp160 présente des régions constantes qui alternent avec des zones hypervariables. Sur toute la gp 160 on dénombre 29 sites N glycosylables potentiels, parmi lesquels 15 sont très conservés dans la famille du VIH-1. Seuls 10 de ces sites sont conservés chez ant70. Par contre, quatre nouveaux sites apparaissent chez cette souche à des endroits inhabituels sur la gp 160.

La répartition de ces sites est généralement la suivante: 11 sur la gp 120 et 4 sur la gp41. Chez Ant70 cette répartition n'est pas respectée, elle est de 7 sur la gp 120 et 3 sur la gp41. Quatre nouveaux sites apparaissent sur la gp120.

Dix neuf résidus de cystéines, très conservés dans la famille du VIH-1, sont dénombrés sur l'enveloppe du virus. Chez Ant70 deux résidus supplémentaires apparaissent au niveau de la région V4 portant le nombre à vingt-un. La présence de ces cystéines supplémentaires pourraient



influencer la structure des épitopes de l'enveloppe virale. Les deux résidus de cystéine de la zone immunodominante de la gp41 sont conservés ainsi que la cystéine C terminale de la gp41.

Les acides aminés qui jouent un rôle dans la liaison gp120-CD4 sont bien conservés entre VIH-1 groupe M et Ant70, excepté ceux des positions 427 où la cystéine remplace la valine et 391 où la sérine remplace la tyrosine (39).

Chez la plupart des isolats VIH-1, la région centrale de la boucle V3 présente le motif GPGQ. Chez Ant 70 c'est la séquence GPMAW qui est retrouvée. La charge électrique de la boucle V3 de Ant70 est légèrement négative (-0,09). Ant70 est une souche non syntitia inductrice et non tropique pour la lignée monocyte- macrophages (39).

LAI MRV... KEKYOHLWRWGKWTMLLGLL-MTCSAATEKLVVTVYVYGVVWKEATTLFASDAKAYDEVHNVWATHA 73  
 OYI MTA... RGTRKNYORLWRWGTMLLGML-MTCSAAENLWVTVYVYGVVWKEATTLFASDARAYATEVHNVWATHA 72  
 ELI MRA... RGIERNCONWVKWIMLLGLL-MTCSAADNLWVTVYVYGVVWKEATTLFASDAKSYETAHNIWATHA 72  
 MAL MRV... REIQRNYNWWRWGMMLLGLL-MTCSAEDLVVTVYVYGVVWKEATTLFASDAKSYETAHNIWATHA 72  
 U455 MRV... MGIGRNYPCLRWWTMILGLI-IIINA-OQLWVTVYVYGVVWKEATTLFASDAKAYDAEVHNVWATHA 71  
 CPZ MKV... MEKKKRDWNSLSIIITIIILLTPCLTSE-LWVTVYVYGVVWHDADPVLFASDAKAHSTEAHNIWATQA 72  
 ANT NIVTMKAMEKRNKLLW-TLYLAM--ALITPCLSLRQLYATVYAGVPVWEDATPVLFASDAATLSTEKHNIWASGA 73

LAI CVPTDPNPQEVVLVNVTENFMWKNMVEQMHEI:ISLWDOQLKPCVKLTPLCVSLKDTDLGNATNTSSNTNSSSGE-M 152  
 OYI CVPTDPNPQEVVLVNVTENFMWKNMVEQMHEI:ISLWDOQLKPCVKLTPLCVTLCDTQVNTTSSLRNAINTTSSSWE 152  
 ELI CVPTDPNPQEVVLVNVTENFMWKNMVEQMHEI:ISLWDOQLKPCVKLTPLCVTLNCSO...ELRNHGTNGHNYTTEE 148  
 MAL CVPTDPNPQEVVLVNVTENFMWKNMVEQMHEI:ISLWDOQLKPCVKLTPLCVTLNCTNVNG:AVNGTNAGSNRTNAEL 152  
 U455 CVPTDPNPQEVVLVNVTENFMWKNMVEQMHEI:ISLWDOQLKPCVKLTPLCVTLCDTQVNTTSSLRNAINTTSSSWE 147  
 CPZ CVPTDPNPQEVVLVNVTENFMWKNMVEQMHEI:ISLWDOQLKPCVKLTPLCVTLCDTQVNTTSSLRNAINTTSSSWE 150  
 ANT CVPTDPNPQEVVLVNVTENFMWKNMVEQMHEI:ISLWDOQLKPCVKLTPLCVTLCDTQVNTTSSLRNAINTTSSSWE 142

LAI MMEKGEIKKCFNISTSIIRGKVOKEYAFFYKLD:IPIDN-DTTS...YTLTSCNTSVITGACFPVVSFEPPIPIHYCAP 225  
 OYI TMEKGEIKKCFNISTSIIRGKVOKEYAFFYKLD:IPIDN-DTTS...YTLTSCNTSVITGACFPVVSFEPPIPIHYCAP 225  
 ELI K...GMKCFNISTSIIRGKVOKEYAFFYKLD:IPIDN-DTTS...YTLTSCNTSVITGACFPVVSFEPPIPIHYCAP 221  
 MAL KMEIGEVKIKCFNISTSIIRGKVOKEYAFFYKLD:IPIDN-DTTS...YTLTSCNTSVITGACFPVVSFEPPIPIHYCAP 225  
 U455 ...MKKCFNISTSIIRGKVOKEYAFFYKLD:IPIDN-DTTS...YTLTSCNTSVITGACFPVVSFEPPIPIHYCAP 218  
 CPZ ...MKKCFNISTSIIRGKVOKEYAFFYKLD:IPIDN-DTTS...YTLTSCNTSVITGACFPVVSFEPPIPIHYCAP 218  
 ANT ...MKKCFNISTSIIRGKVOKEYAFFYKLD:IPIDN-DTTS...YTLTSCNTSVITGACFPVVSFEPPIPIHYCAP 216

LAI AGFALIKKNDKAFNGTGPCINVTVCCTHGIKPVVSTQLLLNGLSLAEEEVVIRSENFITNAKTI:VGLNGSVSEINCTRPN 305  
 OYI AGFALIKKNDKAFNGTGPCINVTVCCTHGIKPVVSTQLLLNGLSLAEEEVVIRSSHFITNAKTI:VGLNGSVSEINCTRPN 305  
 ELI AGFALIKKNDKAFNGTGPCINVTVCCTHGIKPVVSTQLLLNGLSLAEEEVVIRSENLITNAKTI:VGLNGSVSEINCTRPN 301  
 MAL AGFALIKKNDKAFNGTGPCINVTVCCTHGIKPVVSTQLLLNGLSLAEEEVVIRSENLITNAKTI:VGLNGSVSEINCTRPN 305  
 U455 AGFALIKKNDKAFNGTGPCINVTVCCTHGIKPVVSTQLLLNGLSLAEEEVVIRSENLITNAKTI:VGLNGSVSEINCTRPN 295  
 CPZ AGFALIKKNDKAFNGTGPCINVTVCCTHGIKPVVSTQLLLNGLSLAEEEVVIRSENLITNAKTI:VGLNGSVSEINCTRPN 299  
 ANT AGFALIKKNDKAFNGTGPCINVTVCCTHGIKPVVSTQLLLNGLSLAEEEVVIRSENLITNAKTI:VGLNGSVSEINCTRPN 296

43 DOMAIN

LAI NNTFRNRI:SPGRAFT--TKQI:GDI-RGAHCHLSRAATWEKLEQIATK-LRKF-RNIT-IFPSSGGGDEIVTH 373  
 OYI NNTFRNRI:SPGRAFT--TKQI:GDI-RGAHCHLSRAATWEKLEQIATK-LRKF-RNIT-IFPSSGGGDEIVTH 377  
 ELI NNTFRNRI:SPGRAFT--TKQI:GDI-RGAHCHLSRAATWEKLEQIATK-LRKF-RNIT-IFPSSGGGDEIVTH 372  
 MAL NNTFRNRI:SPGRAFT--TKQI:GDI-RGAHCHLSRAATWEKLEQIATK-LRKF-RNIT-IFPSSGGGDEIVTH 376  
 U455 NNTFRNRI:SPGRAFT--TKQI:GDI-RGAHCHLSRAATWEKLEQIATK-LRKF-RNIT-IFPSSGGGDEIVTH 372  
 CPZ NNTFRNRI:SPGRAFT--TKQI:GDI-RGAHCHLSRAATWEKLEQIATK-LRKF-RNIT-IFPSSGGGDEIVTH 372  
 ANT NNTFRNRI:SPGRAFT--TKQI:GDI-RGAHCHLSRAATWEKLEQIATK-LRKF-RNIT-IFPSSGGGDEIVTH 372

LAI SFNCGGGEFFYCNISGLFNSTWNSWSTEGSNTEGSDTITLFCRIKQIVNMWQEVGKAMYAPP:SGG:FCSSKITGLLL 453  
 OYI SFNCGGGEFFYCNISGLFNSTWNSWSTEGSNTEGSDTITLFCRIKQIVNMWQEVGKAMYAPP:SGG:FCSSKITGLLL 451  
 ELI SFNCGGGEFFYCNISGLFNSTWNSWSTEGSNTEGSDTITLFCRIKQIVNMWQEVGKAMYAPP:SGG:FCSSKITGLLL 451  
 MAL SFNCGGGEFFYCNISGLFNSTWNSWSTEGSNTEGSDTITLFCRIKQIVNMWQEVGKAMYAPP:SGG:FCSSKITGLLL 454  
 U455 SFNCGGGEFFYCNISGLFNSTWNSWSTEGSNTEGSDTITLFCRIKQIVNMWQEVGKAMYAPP:SGG:FCSSKITGLLL 447  
 CPZ SFNCGGGEFFYCNISGLFNSTWNSWSTEGSNTEGSDTITLFCRIKQIVNMWQEVGKAMYAPP:SGG:FCSSKITGLLL 438  
 ANT SFNCGGGEFFYCNISGLFNSTWNSWSTEGSNTEGSDTITLFCRIKQIVNMWQEVGKAMYAPP:SGG:FCSSKITGLLL 451

gp120 + gp41

LAI TRDGGNNH-NGS-EIFRPAGGDMRDNRWSELYKYYKVIKIEPLGVAPTAKARRV...QREKRAV:LGAMFLGFLGAAG 522  
 OYI TRDGGKNTNGI-EIFRPAGGDMRDNRWSELYKYYKVIKIEPLGVAPTAKARRV...QREKRAV:LGAMFLGFLGAAG 525  
 ELI TRDGG--INNSTNETFRPAGGDMRDNRWSELYKYYKVIKIEPLGVAPTAKARRV...QREKRAV:LGAMFLGFLGAAG 524  
 MAL TRDGGHSSONSCHNETLRPAGGDMRDNRWSELYKYYKVIKIEPLGVAPTAKARRV...QREKRAV:LGAMFLGFLGAAG 529  
 U455 TRDGG--INNSTNETFRPAGGDMRDNRWSELYKYYKVIKIEPLGVAPTAKARRV...QREKRAV:LGAMFLGFLGAAG 520  
 CPZ TRDGP-VTNNSGNTFRPAGGDMRDNRWSELYKYYKVIKIEPLGVAPTAKARRV...QREKRAV:LGAMFLGFLGAAG 517  
 ANT GMCHTNSSNN-NVTFRPAGGDMRDNRWSELYKYYKVIKIEPLGVAPTAKARRV...QREKRAV:LGAMFLGFLGAAG 529

gp120 + gp130

LAI STMGARSMTLTVQARQLLGGIVQQQNNLLRAIEAGGRLQLTVWGIKQLQARVLAVERYLQDGGLLGIVWCSGKLIETTTA 612  
 OYI STMGARSMTLTVQARQLLGGIVQQQNNLLRAIEAGGRLQLTVWGIKQLQARVLAVERYLQDGGLLGIVWCSGKLIETTTA 606  
 ELI STMGARSVTLTVQARQLLGGIVQQQNNLLRAIEAGGRLQLTVWGIKQLQARVLAVERYLQDGGLLGIVWCSGKLIETTTA 604  
 MAL STMGAASTLTVQARQLLGGIVQQQNNLLRAIEAGGRLQLTVWGIKQLQARVLAVERYLQDGGLLGIVWCSGKLIETTTA 609  
 U455 STMGAASTLTVQARQLLGGIVQQQNNLLRAIEAGGRLQLTVWGIKQLQARVLAVERYLQDGGLLGIVWCSGKLIETTTA 609  
 CPZ STMGAAVTLTVQARQLLGGIVQQQNNLLRAIEAGGRLQLTVWGIKQLQARVLAVERYLQDGGLLGIVWCSGKLIETTTA 597  
 ANT STMGAAATLTVQARQLLGGIVQQQNNLLRAIEAGGRLQLTVWGIKQLQARVLAVERYLQDGGLLGIVWCSGKLIETTTA 609

LAI	VPWNASWS-NKSLQEIWNMTWMEWDREINNYTSLIHSLEESONQOEKNEGELLELDKWSLWVWFNITNWLWYIKIFI	69:
OYI	VPWNASWS-NKSLNEIWDNMTWMEWEREIDNYTMLIYTLIEESONQOEKNEOELLELDKWSLWVWFNITNWLWYIRIFI	685
ELI	VPWNSSWS-NRSLNEIWNMTWMEWEREIDNYTGLIYSLIEESONQOEKNEELLELDKWSLWVWFNITNWLWYIKIFI	683
MAL	VPWNSSWS-NRSLDDIWNMTWMEWEKEISNYTGIYNLIEESONQOEKNEELLELDKWSLWVWFNITNWLWYIRIFI	688
455	VPWNSSWS-NKSOEDIWNMTWMEWEKEISSYTGIYQLIEESONQOEKNELDLLALDKWANLXWVFNISNWLWYIRLFI	679
CPZ	VPWNSSWPGSNSTODIWGNLTWQWDKLVSNITGKIFGLLEEASQOEKNEKNELDLLALDKWANLXWVFNISNWLWYIKIFI	677
ANT	VKNRTWIGNES...INWDTLWQEWDRQISNISTIEYEEIQKAQVQOQEKNEKLELDEWASINWLOITKWLWYIKIF	686
LAI	MIVGGLVGLRIVFAVLSIVNRVROGYSPLSFOTLPTPAGP-DRPEGIEEEGGERDRDRSIRLVNGLSALIWDDLRSLL	770
OYI	IIVGGLVGLRIVFAVLSIVNRVROGYSPLSFOTLPTPAGP-DRPEGIEEEGGERDRDRSIRLVNGLSALIWDDLRSLL	764
ELI	MIVGGLVGLRIVFAVLSIVNRVROGYSPLSFOTLPTPAGP-DRPEGIEEEGGERDRDRSIRLVNGLSALIWDDLRSLL	762
MAL	IIVGGLVGLRIVFAVLSIVNRVROGYSPLSFOTLPTPAGP-DRPEGIEEEGGERDRDRSIRLVNGLSALIWDDLRSLL	768
455	IIVGGLVGLRIVFAVLSIVNRVROGYSPLSFOTLPTPAGP-DRPEGIEEEGGERDRDRSIRLVNGLSALIWDDLRSLL	758
CPZ	MAVGGVGLRIVFAVLSIVNRVROGYSPLSFOTLPTPAGP-DRPEGIEEEGGERDRDRSIRLVNGLSALIWDDLRSLL	756
ANT	IIVGALVGLRIVFAVLSIVNRVROGYSPLSFOTLPTPAGP-DRPEGIEEEGGERDRDRSIRLVNGLSALIWDDLRSLL	765
LAI	FSYHRLRDLLEAVRIVELLGRG.....GWEALXYWV..NLLQYWSQELKNSAVSLLNATAIAVAEGTDRVIEVVOG	840
OYI	FSYHRLRDLLEAVRIVELLGRG.....GWEVLYWV..NLLQYWSQELKNSVSLLNATAIAVAEGTDRVIEVVOG	834
ELI	FSYHRLRDLLEAVRIVELLGRG.....GWDILXYWV..NLLQYWSQELKNSVSLLNATAIAVAEGTDRVIEVVOG	832
MAL	FSYHRLRDLLEAVRIVELLGRG.....GWEALXYWV..NLLQYWSQELKNSAVSLLNATAIAVAEGTDRVIEVVOG	839
455	FSYHRLRDLLEAVRIVELLGRG.....GWEALXYWV..NLLQYWSQELKNSAVSLLNATAIAVAEGTDRVIEVVOG	835
CPZ	FSYHRLRDLLEAVRIVELLGRG.....GWEALXYWV..NLLQYWSQELKNSAVSLLNATAIAVAEGTDRVIEVVOG	833
ANT	FSYHRLRDLLEAVRIVELLGRG.....GWEALXYWV..NLLQYWSQELKNSAVSLLNATAIAVAEGTDRVIEVVOG	842
LAI	ACRAIRHIFRRIPGGLERALL	861
OYI	AYRAFVNIIFRRIPGGLERALL	855
ELI	ACRAVNIIFRRIPGGLERALL	853
MAL	FIQRAVNIIFRRIPGGLERALL	859
455	IQRAVNIIFRRIPGGLERALL	856
CPZ	FIQRAVNIIFRRIPGGLERALL	854
ANT	IQRAVNIIFRRIPGGLERALL	863

Ullustration n°6: d'Après MARLEEN V. coll (39)

Alignement des séquences du gène Env de plusieurs souches de VIH-1 avec celle de Ant70. Les sites N-glycosylables sont soulignés. Les cystéines sont encadrées. Les régions concernées par la fixation CD4 sont indiquées par des points noirs. Les sites N-glycosylables particuliers à Ant70 sont encadrés. Le nombre à l'extrémité droite de la séquence aminée indique le nombre de résidus d'acides aminés.

Tableau n°1: COMPARAISON DES SEQUENCES D'ENVELOPPE DES DIFFERENTES SOUCHES (VIH et SIV (44)

	VHI-1 Lain	VIH-1 Eli	VIH-1 Mal	VIH-1 U455	SIV CFZGaB	VIH-2 Rod	SIV Mal 251	SIV AGMTYO	VIH-1 Ant70	VIH-1 MVP5180
HIV-1 Eli	70									
HIV-1 Mal	76	80								
HIV1 U455	75	74	76							
SIVCPZGab	61	62	63	63						
HIV-2 Rod	38	39	39	40	39					
SIVMac251	37	37	38	38	38	74				
SIVAGMTYO	37	36	37	38	40	46	47			
HIV-1 70ant	51	52	52	52	53	33	32	33		
HIV-1 MVP5180	51	52	54	51	52	36	33	34	70	
HIV-1 Vau	50	51	52	51	54	35	34	35	70	71

Le tableau ci- dessus donne les pourcentages des homologies séquentielles entre différentes souches VIH et SIV. Les souches VIH-1 groupe M présentent entre elles plus de 60% d'homologie. Tandis qu'on retrouve moins de 60% d'homologie entre ces souches et celles du groupe O. Les souches du groupe O présentent plus de 70% d'homologie entre elles.

# METHODOLOGIE

## A/ Echantillonnage

Les travaux ont été réalisés:

- sur les sérums provenant de toutes les régions du Mali prélevés entre Février 1992 et Mai 1993 lors de la précédente enquête nationale sur la séroprévalence du VIH au Mali soit 277 sérums.

- Sur les sérums prélevés chez des sujets qui se présentaient au laboratoire de sérologie de l'INRSP (Institut National de Recherche en Santé Publique) pour dépistage du VIH pendant la période comprise entre le 6 Décembre 1994 et le 15 Janvier 1995 soit 26 sérums.

Les modalités de recrutement ayant participé à l'enquête nationale sur la séroprévalence du VIH au Mali ont été décrits précédemment par TOURE Z. (60).

### 1- Critères d'inclusion:

- Tout sérum provenant de prélèvement de sang non hémolysé réactif au clonatec pour le VIH-1 ou pour le VIH-1+2 et confirmé soit au Western blot soit au Pepti-lav.

- Les prélèvements de sang non hémolysés de prostituée non réactif au Clonatec pour le VIH-1 et pour le VIH-2.

### 2- Critères d'exclusion:

- Tout sérum provenant de prélèvement de sang hémolysé.

- Tout sérum provenant d'un prélèvement de sang non hémolysé réactif au clonatec mais non confirmé au Western blot ou au Pepti-lav.

### 3- Collecte des sérums:

200µl de chaque sérum retenu sont recueillis dans un tube Eppendorf étiqueté, portant un indice et un numéro d'échantillon. Les indices portés sur les étiquettes sont:

- Ib pour les sérums VIH-1 recueillis à l'INRSP et confirmés au Western blot.

- Ip pour les sérums recueillis à l'INRSP et confirmés au Pepti-lav.

- In pour les sérums de prostituées séronégatives.

Les sérums ainsi aliquotés ont été conservés au congélateur puis transportés congelés jusqu'au laboratoire de virologie de l'ORSTOM (Office de Recherche Scientifique et Technique d'Outre Mer) à Montpellier (Sud de la France) où les tests pratiques pour la recherche du VIH-1 groupe O ont été effectués.

## **B/ Recherche pratique des virus du groupe O**

Pour rechercher les souches virales VIH-1 du groupe O, nous avons utilisé des tests immuno-enzymatiques:

- un test de dépistage au groupe O Innotest VIH-1 groupe O (Immunogenetic, Belgium) sur tous les sérums,
- un test de confirmation (Inno-lia, Innogenetic, Belgium) sur les sérums réactifs à innotest.

### **1- Innotest VIH-1 groupe O (innogenetic, Belgium)**

#### **a) Principe:**

C'est une technique immunoenzymatique indirecte de type Elisa (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) permettant de détecter la présence des anticorps (Ac) spécifiques dirigés contre les souches virales Ant70 est MVP5180. Les peptides des boucles V3 des deux virus sont fixés dans des microplaques. Le sérum à analyser est dilué et mis en contact avec les peptides purifiés. Si les anticorps sont présents dans le sérum, ils vont se fixer sur les peptides selon la réaction Ag-Ac. L'excès d'anticorps est éliminé par lavage. Les anticorps de lapin anti-IgG humains couplés à des peroxydases de cheval vont se fixer sur les anticorps liés aux antigènes. Un deuxième lavage est fait pour éliminer l'excès de conjugué qui n'a pas réagit. L'addition du substrat de l'enzyme donne une coloration permettant de mettre en évidence la présence des anticorps dans le sérum. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'Ac présents dans le sérum.

#### **b) Mode opératoire**

Avant de commencer les essais, ajuster la température d'un bain marie à 37°C.

- Prendre une microplaque avec le nombre de bandelettes nécessaires. Généralement pour plus de deux tests on prendra deux contrôles négatifs et deux contrôles positifs.
- Mettre 100µl de diluant (tampon de chlorure de phosphate bisodique) dans chaque puits.
- Ajouter 10µl de sérum à étudier ou de sérum de contrôle positif ou négatif dans les puits correspondants.
- Agiter sur agitateur rotatif tridimensionnel pour assurer un mélange homogène entre le sérum et le diluant.
- Ajouter 100µl de diluant dans chaque puits.
- Couvrir les puits avec un ruban adhésif.

- Incuber pendant 60mn à 37°C. Pendant ce temps préparer le conjugué en les diluant au 1/100 à l'aide de diluant (tampon de phosphate contenant des protéines, une enzyme stabilisatrice et 0,05% kathon comme conservateur).
- Laver chaque puits cinq fois.
- Ajouter 200µl de conjugué dans les puits.
- Sécouer longuement pour assurer le mélanger.
- Couvrir les puits à nouveau avec un ruban adhésif.
- Incuber 37°C pendant 60mn. Pendant ce temps préparer le substrat en diluant le concentré de triméthyl benzene au 1/100 dans le diméthyl sulfoxyde. Laver les puits 5 fois.
- Ajouter 200µl de substrat dans chaque puit agiter et sécouer doucement pour mélanger. Ajouter suivant l'ordre à laquelle a été effectué l'addition du substrat, l'acide sulfurique dans chaque puit pour arrêter la réaction. Sécouer doucement pour assurer le mélange.
- Faire la lecture de l'intensité d'absorbance ou densité optique au spectrophotométrie à 450nm.

Les échantillons dont la densité optique DO est supérieure à 0,250 sont déclarés réactifs. Toutefois une confirmation par Inno-Lia est nécessaire.

## **2- Inno-Lia VIH-1 groupe O (Innogenetics, Belgium)**

### *a) Principe:*

Des protéines et des peptides de recombinaison du VIH-1 groupe M et VIH-1 groupe O sont exprimés par Escherichia Coli ou synthétisés chimiquement, après purification et optimisation de la concentration, les peptides individuels sont enrobés en ligne sur les bandelettes de nylon sur support en plastique. Les peptides enrobés sur les bandelettes sont la RP135 du VIH-1 consensuel, la RP135 du VIH-1 Mal (une souche M Zaïroise), la boucle V3 de VIH-1 VI686 (une souche O gabonaise), la boucle V3 de Ant70 et MVP5180, la gp41 de MVP5180 et la gp41 du VIH-1 consensuel. En plus de ces antigènes des lignes de contrôle sont présentes sur chaque bandelette (contrôle négatif, trace, positif, très positif).

L'échantillon à analyser est incubé dans des cuves en présence des bandelettes enrobées. Les Ac spécifiques s'ils sont présents, viendront se fixer spécifiquement sur les antigènes (Ag), par la suite les anticorps anti-humains complexés à la phosphatase alcaline sont ajoutés. En cas de réaction positive, les Ac anti-humain se fixent sur les complexes Ac-Ag formés. L'incubation du substrat de l'enzyme produit une coloration brune qui est proportionnelle à la quantité des Ac spécifiques présents dans le sérum. L'addition d'acide sulfurique permet d'arrêter le développement de la coloration. La positivité

ou la négativité de la réaction est déterminée par visualisation et comparaison avec les lignes de contrôle.

*b) Mode opératoire:*

- Prendre le nombre de cuves nécessaires pour la réalisation des tests en prenant en compte le fait que pour chaque essai il faut un contrôle négatif et un contrôle positif.
- A la cuve contenant les bandelettes ajouter une solution de diluant.
- Mettre 10µl de sérum sur la bandelette test.
- 1ml de contrôle positif ou négatif sur les bandelettes appropriées.
- Incuber pendant 60mn à (15°C-30°C) sur agitateur rotatif tridimensionnel. Préparer le conjugué entre temps en diluant la solution de conjugué IgG anti-humain au 1/100.
- Laver 3 fois chaque bandelette.
- Ajouter 1ml de conjugué à chaque cuve.
- Incuber pendant 30mn à 15°C-30°C sur agitateur rotatif. Pendant ce temps préparer le substrat.
- Rincer 3 fois avec la solution de lavage, ajouter 1ml de substrat dans chaque cuve.
- Incuber pendant 30mn sur agitateur rotatif à 15 à 30°C.
- Aspirer les liquides.
- Ajouter 1ml d'acide sulfurique pour arrêter la réaction; incuber pendant 10-30mn à 15°C-30°C sur agitateur rotatif.
- Enlever les bandelettes des cuves à l'aide d'une pince et déposer sur du papier absorbant
- Sécher les bandelettes et procéder à la lecture.

LECTURE ET INTERPRETATION

1	2	3	4							
1	2	3	4	RP135	RP135	RP135	V3	V3	Gp41	Gp41
				Con	Mal	Ant70	686	5180	5180	5180

L'interprétation des bandelettes Inno-lia se fait par visualisation selon l'intensité de l'agglutination Ag-Ac observée sur chaque peptide et par comparaison avec les lignes de contrôle présents sur la bandelette et numérotés de 1 à 4.



- Un peptide est insensible (0) à un serum si l'intensité de sa réactivité à l'égard de ce sérum est inférieure à l'intensité de la ligne 2 sur la bande inno-lia.

- Un peptide réagit faiblement ( $\pm$ ) si l'intensité de sa réactivité est égale à l'intensité de la ligne 2 sur la bandelette Inno-lia.

- Un peptide réagit (+1) si l'intensité de sa réactivité est égale à l'intensité de la ligne 3 ou comprise entre celle de la ligne 3 et la ligne 4. C'est à dire  $3 \leq x < 4$

- Un peptide réagit (+2) si l'intensité de sa réactivité est égale à celle de la ligne 4 ou comprise entre l'intensité de la ligne 4 et la ligne 1. C'est à dire  $4 \leq x < 1$

- Un peptide réagit (+3) si l'intensité de sa réactivité est égale à l'intensité de la ligne 1 sur la bande Inno-lia .

- Un peptide réagit (+4) si l'intensité de sa réactivité est supérieure à l'intensité de la ligne 1.

## RESULTATS

Tableau n°2: Composition de l'échantillon de travail suivant le statut sérologique:

Statut sérologique	Effectif	Pourcentage
Serums VIH1	198	65,3
Serums VIH1+2	33	10,9
Serums VIH (-)	72	23,8
Total	303	100

Plus de la moitié (65,3%) de nos échantillons sont infectés par le VIH1

Tableau n°3: Résultats sérologiques détaillés au test de dépistage et de confirmation:

Inno-Lia Groupe O										
Echantillons	VIH statut	Innotest DO	RP155 CON	RP135 Mal	RP135 Ant70	V3 VI-686	V3 MVP5180	GP41 5180	GP41 VIH1	Résultats
Ib 1	1									
Ib 2	1									
Ib 4	1									
Ib 5	1									
Ib 6	1									
Ib 7	1									
Ib 8	1									
Ib 9	1									
Ib 10	1									
Ib 11	1									
Ib 89	1									
Ib 90	1									
Ib 91	1	0,476	+3	+3	±	±	±	±	+3	-
Ib 92	1									
Ib 93	1									
Ib 94	1									
Ib 95	1									
Ib 96	1									
Ib 97	1									
Ib 98	1									
Ib 99	1									
Ib 100	1									
Ib 101	1									
Ib 102	1									
Ib 103	1									
Ib 104	1									
Ib 105	1									
Ib 106	1									
Ib 107	1									
Ib 108	1									
Ib 109	1									
Ib 110	1									
Ib 111	1									
Ib 112	1	0,843	+3	+3	-	-	+3	-	+3	+
Ib 113	1									

L'échantillon identifié Ib 91 est réactif à Innotest. Sur la bande Inno-lia il présente des traces d'agglutinations sur les peptides qui caractérisent le groupe O. L'échantillon Ib 112 est réactif à Innotest et à Inno-lia. Les autres échantillons sont négatifs.

Tableau n°4: Résultats sérologiques détaillés au test de dépistage et de confirmation:

Inno-Lia Groupe O										
Echantillons	VIH statut	Innotest DO	RP155 CON	RP135 Mal	RP135 Ant70	V3 VI-686	V3 MVP5180	GP41 5180	GP41 VIH1	Résultats
Ib 114	1									
Ib 115	1									
Ib 116	1									
Ib 117	1									
Ib 118	1									
Ib 119	1									
Ib 120	1									
Ib 121	1									
Ib 122	1									
Ib 123	1									
Ib 124	1									
Ib 125	1									
Ib 126	1									
Ib 127	1									
Ib 128	1									
Ib 129	1									
Ib 130	1									
Ib 131	1									
Ib 132	1									
Ib 133	1									
Ib 134	1									
Ib 135	1									
Ib 137	1									
Ib 138	1									
Ib 139	1									
Ib 140	1									
Ib 141	1									
Ib 142	1									
Ib 143	1									

Tous les échantillons de ce tableau ont réagit négatif à Innotest.

Tableau n°5: Résultats sérologiques détaillés au test de dépistage et de confirmation:

Inno-Lia Groupe O										
Echantillons	VIH statut	Innotest DO	RP155 CON	RP135 Mal	RP135 Ant70	V3 VI-686	V3 MVP5180	GP41 MVP5180	GP41 VIH-1	Résultats
Ib 144	1									
Ib 145	1									
Ib 146	1									
Ib 147	1									
Ib 148	1									
Ib 149	1									
Ib 150	1									
Ib 151	1									
Ib 152	1									
Ib 153	1									
Ib 154	1									
Ib 155	1									
Ib 156	1									
Ib 157	1									
Ib 158	1									
Ib 159	1									
Ib 160	1									
Ib 161	1									
Ib 162	1									
Ib 163	1									
Ib 164	1									
Ib 165	1									
Ib 166	1									
Ib 167	1									
Ib 168	1									
Ib 169	1									
Ib 170	1									
Ib 171	1									
Ib 172	1									
Ib 173	1									
Ib 174	1									
Ib 175	1	0,306	±	+3	-	-	-	-	+3	-
Ib 176	1									
Ib 177	1									
Ib 178	1									
Ib 179	1									

L'échantillon identifié Ib 175 est réactif à Innotest; sa confirmation à Inno-lia est négative. Les autres échantillons sont négatifs.

Tableau n°6: Résultats sérologiques détaillés au test de dépistage et de confirmation:

Echantillons	VIH statut	Innotest DO	Inno-Lia Groupe O							Résultats
			RP155 CON	RP135 Mal	RP135 Ant70	V3 VI-686	V3 MVP5180	GP41 5180	GP41 VIH-1	
Ib 180	1									
Ib 181	1									
Ib 182	1									
Ib 183	1	0,467	-	±	-	-	-	-	±	-
Ib 185	1									
Ib 186	1									
Ib 187	1									
Ib 188	1									
Ib 189	1									
Ib 190	1									
Ib 191	1									
Ib 192	1									
Ib 193	1									
Ib 194	1									
Ib 195	1									
Ib 196	1									
Ib 197	1									
Ib 198	1									
Ib 199	1									

L'échantillon identifié Ib 183 est réactif à Innotest; la confirmation à Inno-lia est négative. Les autres échantillons ont réagit négatifs à Innotest.

Tableau n°7: Résultats sérologiques détaillés au test de dépistage et de confirmation:

Echantillons	VIH statut	Innotest DO	Inno-Lia Groupe O							Résultats
			RP155 CON	RP135 Mal	RP135 Ant70	V3 VI-686	V3 MVP5180	GP41 MVP5180	GP41 VIH-1	
Ib 200										
Ib 201										
Ib 202										
Ib 203										
Ib 204										
Ib 205										
Ib 206										
Ib 207										
Ib 208										
Ib 209										
Ib 210										
Ib 211										
Ib 212										
Ib 213										
Ib 214										
Ib 215										

Tous les échantillons de ce tableau ont réagit négatif à Innotest.

Tableau n°8: Résultats sérologiques détaillés au test de dépistage et de confirmation:

Inno-Lia Groupe O										
Echantillons	VIH statut	Innotest DO	RP155 CON	RP135 Mal	RP135 Ant70	V3 VI-686	V3 MVP5180	GP41 MVP5180	GP41 VIH-1	Résultaté
Ib 318	1									
Ib 319	1									
Ib 320	1									
Ib 321	1									
Ib 322	1									
Ib 323	1									
Ib 324	1									
Ib 325	1									
Ib 326	1									
Ib 327	1									
Ib 328	1									
Ib 329	1									
Ib 330	1									
Ib 331	1									
Ib 332	1									
Ib 333	1									
Ib 335	1									
Ib 336	1									
Ib 337	1									
Ib 407	1									
Ib 442	1									
Ib 452	1									
Ib 453	1									
Ip 47	1									
Ip 48	1									
Ip 49	1									
Ip 50	1									
Ip 51	1									
Ip 52	1									
Ip 53	1									
Ip 54	1									

Les échantillons de ce tableau ont réagit négatif à Innotest.



Tableau n°9: Résultats sérologiques détaillés au test de dépistage et de confirmation:

Inno-Lia Groupe O										
Echantillons	VIH statut	Innotest DO	RP155 CON	RP135 Mal	RP135 Ant70	V3 VI-686	V3 MVP5180	GP41 MVP5180	GP41 VIH-1	Résultats
Ip 56	1									
Ip 57	1									
Ip 58	1									
Ip 59	1									
Ip 60	1									
Ip 61	1									
Ip 62	1									
Ip 63	1									
Ip 64	1									
Ip 65	1									
Ip 66	1									
Ip 67	1									
Ip 68	1									
Ip 69	1									
Ip 70	1									
Ip 71	1	0,309	+3	+3	-	-	-	-	+3	-
Ip 72	1									
Ip 73	1									
Ip 74	1									
Ip 75	1									
Ip 76	1									
Ip 77	1									
Ip 78	1									
Ip 79	1									
Ip 80	1									
Ip 81	1									
Ip 82	1									
Ip 83	1									
Ip 84	1									
Ip 85	1									
Ip 86	1									
Ip 87	1									

L'échantillon Ip 71 est réactif à Innotest la confirmation à Inno-lia est négative. Les autres sont négatifs à Innotest.

Tableau n°10: Résultats sérologiques détaillés au test de dépistage et de confirmation:

Inno-Lia Groupe O										
Echantillons	VIH statut	Innotest DO	RP155 CON	RP135 Mal	RP135 Ant70	V3 VI-686	V3 MVP5180	GP41 MVP5180	GP41 VIH-1	Résultats
Ip 13	1+2									
Ip 14	1+2									
Ip 15	1+2									
Ip 16	1+2									
Ip 17	1+2									
Ip 18	1+2									
Ip 19	1+2									
Ip 20	1+2									
Ip 21	1+2									
Ip 22	1+2									
Ip 23	1+2									
Ip 24	1+2	1,264	+3	+3	-	-	-	-	+3	-
Ip 25	1+2									
Ip 26	1+2									
Ip 27	1+2									
Ip 28	1+2									
Ip 29	1+2									
Ip 30	1+2									
Ip 31	1+2									
Ip 32	1+2									
Ip 33	1+2									
Ip 34	1+2									
Ip 35	1+2									
Ip 36	1+2									
Ip 37	1+2									
Ip 40	1+2									
Ip 41	1+2									
Ip 42	1+2									
Ip 43	1+2									
Ip 44	1+2									
Ip 45	1+2									
Ip 46	1+2									
Ip 88	1+2									

L'échantillon identifié Ip 24 est fortement réactif à Innotest. Sa densité optique est très élevée (le seuil étant fixé à 0,250). Sa réaction sur la bandelette Inno-lia est celle d'une souche VIH-1 du groupe M.

Tableau n°11: Résultats sérologiques détaillés au test de dépistage et de confirmation:

Inno-Lia Groupe O										
Echantillons	VIH statut	Innotest DO	RP155 CON	RP135 Mal	RP135 Ant70	V3 VI-686	V3 MVP5180	GP41 MVP5180	GP41 VIH-1	Résultats
In 434	-									-
In 440	-									-
In 457	-									-
In 458	-									-
In 459	-									-
In 460	-									-
In 461	-									-
In 462	-									-
In 463	-									-
In 464	-									-
In 465	-									-
In 466	-									-
In 467	-									-
In 468	-									-
In 469	-									-
In 470	-									-
In 471	-									-
In 472	-									-
In 473	-									-
In 474	-									-
In 475	-									-
In 476	-									-
In 477	-									-
In 478	-									-
In 479	-									-
In 480	-									-
In 481	-									-
In 482	-									-
In 483	-									-
In 484	-									-
In 485	-									-
In 486	-									-

Les sérums de ce tableau ont été prélevés chez des prostituées. Ils sont négatifs au clonatec HIV-1+2 Ab EIA. Leur réaction à Innotest groupe O est également négative.

Tableau n°12: Résultats sérologiques détaillés au test de dépistage et de confirmation:

Echantillons	VIH statut	Innotest DO	Inno-Lia Groupe O							Résultats
			RP155 CON	RP135 Mal	RP135 Ant70	V3 VI-686	V3 MVP5180	GP41 MVP5180	GP41 VIH-1	
In 487	-									
In 488	-									
In 489	-									
In 490	-									
In 491	-									
In 492	-									
In 493	-									
In 494	-									
In 495	-									
In 496	-									
In 497	-									
In 498	-									
In 499	-									
In 500	-									
In 501	-									
In 502	-									
In 503	-									
In 505	-									
In 506	-									
In 507	-	0,387	-	-	-	-	-	-	-	-
In 508	-									
In 509	-									
In 510	-									
In 511	-									
In 512	-									
In 513	-									
In 514	-									
In 515	-									
In 516	-									
In 517	-									

Tous les échantillons de ce tableau sont négatifs au clonatec VIH-1+2 Ab EIA. Les prélèvements ont été effectués chez des prostituées. L'échantillon identifié In 507 est réactif à Innotest, sa confirmation à Inno-lia est négative. Les autres échantillons ont réagi négativement à Innotest.

Tableau n°14: Résultats sérologiques détaillés au test de dépistage et de confirmation:

Echantillons	VIH statut	Innotest DO	Inno-Lia Groupe O							Résultats
			RP155 CON	RP135 Mal	RP135 Ant70	V3 VI-686	V3 MVP5180	GP41 MVP5180	GP41 VIH-1	
In 518	-									
In 519	-									
In 520	-									
In 523	-									
In 524	-									
In 525	-									
In 526	-									
In 527	-									
In 528	-									
In 529										
C.P	1		-	-	+3	+3	+3	+3	+3	+

CP: Contrôle positif.

Les échantillons de ce tableau sont négatifs au clonatec. Ils ont été prélevés chez des prostituées. Ils sont négatifs à Innotest.

Tableau n°15: Résultats statistiques au test de dépistage (Innotest groupe O Innogenetic, Belgium)

Statut sérologique	Effectif	Nombre de sérums réactifs
VIH-1	198	6
VIH-1+2	33	1
VIH (-)	72	1

Sur les 303 sérums 8 sont réactifs à Innotest groupe O. Toutes les classes sérologiques sont représentées. La classe des VIH-1 avec six sérums réactifs est la plus représentée.

Tableau 16: Résultats statistiques au test de confirmations (Inno-Lia groupe O Innogenetics, Belgium)

Classe sérologique	Effectif total	Nombre de sérums traités	Nombre de sérums positifs	Prévalence au sein de la classe sérologique
VIH-1	198	6	1	0,5%
VIH-1+2	33	1	0	
VIH (-)	72	1	0	

Des 8 sérums traités 1 seul est confirmé positif. C'est le sérum identifié Ib 112 , il présente cependant une réactivité particulière, il réagit fortement avec la boucle V3 de MVP5180 . Il est non réactif sur les autres peptides des souches du groupe O.

## DISCUSSION

Nous avons entrepris la recherche des souches virales du VIH-1 groupe O au Mali sur un échantillon de 303 sérums. Dans le cadre d'un projet visant à étudier l'épidémiologie du VIH-1 groupe O en Afrique de l'Ouest, Martine P. et al (41) ont travaillé sur 144 sérums du Niger, 878 sérums du Togo et 2235 sérums du Sénégal. Au Nigeria, Mulanga C. (43) réalise une série de 2083 sérums. Tandis qu'au Cameroun, Zekeng et al (66) d'une part et Lutz G. (37) d'autre part rassemblent respectivement 256 et 261 sérums.

Nos échantillons proviennent des différentes régions du pays, tous les villages et villes de plus de 1000 habitants à l'exception des régions touchées entre 1992 et 1993 par la rébellion Touareg. Au Cameroun, seul le CHU (Centre Hospitalier Universitaire) de la ville de Yaoundé est concerné par le recrutement de Lutz (37). Dans la série de Zekeng (66), quatre villes sont concernées; le grand Nord du pays qui représente près de la moitié du territoire ainsi que la ville de Douala Capitale économique ne sont pas concernés. Au Nigeria seul l'état du Cross River frontalier au Cameroun est concerné par le recrutement. Les auteurs des autres séries ne font pas mention du lieu de recrutement. Toutefois l'on peut penser qu'ils se sont opérés dans les capitales des différents pays concernés du fait de la présence dans ces lieux de structures permettant le dépistage du VIH, et du manque de moyens financiers et didactiques pour entreprendre un recrutement couvrant tout le territoire de ces différents pays.

Le type 1 du VIH comprend deux groupes. Le groupe M et le groupe O. Toutefois dans la composition des différentes séries en vue de la recherche des souches virales du groupe O, plusieurs classes sérologiques apparaissent. La classe des VIH-1, la classe des VIH-1+2, la classe des VIH-indéterminés, la classe des VIH (-) et même la classe des VIH-2.

Dans la série sénégalaise, 40 sérums présentent un Western blot indéterminé, 1108 sont négatifs. Dans la série togolaise 228 sérums sont négatifs. dans la série nigériane 87 sérums sont indéterminés, 1813 sont négatifs. Dans nos échantillons 33 sérums sont VIH-1+2 et 72 sont négatifs.

La présence des classes sérologiques autres que celle des VIH-1 dans les différentes séries visait à vérifier sinon à confirmer par d'éventuels exemples, dans le cas où des sérums de ces classes venaient à être positif au groupe O, les travaux de Charles S. et al (10). Ces auteurs ont essayé dix tests VIH-1 certifiés par US Food and Drug Administration sur 8 sérums camerounais VIH-1 groupe O. Ils sont parvenus à la conclusion suivant laquelle certains tests pouvaient être mis à défaut par les virus du groupe O. Cet avis est partagé par Simon F. et al (20) qui ont mené une étude similaire en France sur

10 sérums positifs au VIH-1 groupe O dont 8 étaient camerounais et 2 français. Certaines trousse de dépistage ont été mises à défaut au cours de ces études, mais seule la trousse HIV-1+2 Ab EIA Clonatec a été systématiquement prise à défaut par les 10 sérums.

Dans les différentes séries (sénégalaise, nigérienne, togolaise, nigériane) aucun cas de sérum non positif à VIH-1 ne s'est révélé positif à un test de dépistage du groupe O. Cependant dans notre série, l'échantillon identifié In 507 a été réactif au Innotest groupe O (Innogenetics, Belgium), avec une densité optique de 0,387 (le seuil étant 0,250). La confirmation à Inno-Lia groupe O n'a pas été positive. Ces résultats ne nous permettent pas d'appuyer les conclusions des travaux des équipes de Charles S. et al (10) et de Simon F. et al (20). Toutefois des études reprenant les protocoles de Charles S. et al; Simon F. et al mériteraient d'être entreprises afin de vérifier, sur un échantillon de sérums VIH-1 groupe O positifs plus large, les conclusions des travaux de ces auteurs.

Différentes méthodes sont utilisées pour le typage des virus, l'on peut citer le séquençage du génome et des protéines virales, le clonage des produits de la PCR, la méthode immunoenzymatique et l'Heteroduplex Mobility Assay (HMA).

Nous avons utilisé la méthode des tests immunoenzymatiques. Cette approche du travail se retrouve chez Mulanga C. au Nigeria (43) Chez Martine P et al (41) sur les séries sénégalaise, nigérienne et togolaise, au Cameroun avec Zekeng et al (63), Lutz et al (37) dans sa première série.

La démarche de Mulanga (43) ainsi que celle de Martine P et al (41) sont les plus proches de la nôtre, de part les tests sérologiques utilisés. Ils utilisent en effet Innotest et Inno-Lia groupe O (Innogenetic, Belgium). Ce qui les écarte un peu de notre démarche est que, ces auteurs après les deux premiers tests cités plus haut réalisent en plus sur les échantillons positifs un Western blot dont le support antigénique est composé des protéines de la souche Ant70.

Zekeng. (66) dans sa démarche traite tous ses sérums à l'Elisa MVP5180 puis à donatec 1+2. Il soupçonne un sérum positif au groupe O, lorsque celui-ci présente un Elisa 1+2 positif ou/et un Elisa MVP5180 positif et un clonatec négatif ou faiblement positif. Un tel sérum est repris au Western blot II pour écarter l'éventualité d'un VIH-2 (66).

Lutz dans sa première série utilise sur des sérums VIH-1 confirmé un Western blot MVP5180 spécifiques (37).

L'utilisation courante de la méthode des tests immunoenzymatiques s'explique par le fait que ces tests sont faciles à mettre en oeuvre dans le cadre des enquêtes épidémiologiques par rapport aux



autres méthodes de typage qui exigent une extraction préalable du DNA. Ces dernières étant en plus laborieuses et onéreuses, nécessitant la mise en place d'équipements techniques de pointe (40).

A l'issue d'une étude menée sur des sérums recueillis dans divers pays (Brésil, Cameroun, Côte d'Ivoire, Niger, Gabon, Zaïre, Kenya, Rwanda) et dont l'objectif était de déterminer chez des séropositifs la circulation des anticorps dirigés contre les boucles V3 de dix souches virales, Martine P. et al (40) ont noté que les anticorps n'étaient pas toujours croisés entre les sous-types et même entre les souches du même sous-type du groupe M.

Notre travail nous a permis d'isoler un sérum dont la réactivité vérifiait ce constat au sein du groupe O. En effet l'échantillon identifié Ib112 a donné une densité optique de 0,843 à Innotest (le seuil de positivité étant fixé à 0,250). Sur la bande Inno-lia, le sérum a présenté une agglutination Ag-Ac sur le peptide V3-5180 et sur les peptides des souches du groupe M Con et Mal. Les peptides RP135 Ant70, V3-686 et gp41-5180 des souches du groupe O n'ont présenté aucune réaction avec les anticorps du ce sérum.

Au Nigeria, sur 2083 échantillons qu'elle a collectés, Mulanga C. (43) a isolé un sérum présentant une réactivité similaire. Ici, parmi les peptides du groupe O, seul le peptide RP135 Ant70 a présenté une agglutination Ag-Ac avec les anticorps du sérum. Les autres peptides du groupe O n'ont pas réagit avec le sérum. Par contre le sérum a fortement réagit sur tous les peptides des souches du groupe M.

L'interprétation et la lecture de la bande Inno-lia ne nous permet pas de classer rigoureusement le virus de l'échantillon Ib 112.

Cet échantillon ainsi que celui décrit par Mulanga C. (43) au Nigeria nous amène à poser l'hypothèse de l'existence dans la sous-région ouest africaine d'un groupe ou d'un sous-type du VIH-1 intermédiaire entre les groupes O et M. Ce nouveau groupe de virus présenterait alors les caractères des souches du groupe M et certains caractères des virus du groupe O. Cette hypothèse mériterait d'être vérifiée par des travaux futures qui iront jusqu'au séquençage de l'ADN des virus concernés.

## CONCLUSION - RECOMMANDATIONS

L'étude que nous avons menée nous a permis d'établir l'évidence d'une souche virale anormale au Mali. Cette souche présente à la fois les caractères génétiques et antigéniques des souches du groupe M et certains caractères antigéniques des souches du groupe O. La prévalence de cette souche chez les porteurs maliens du VIH-1 est de 0,5%. Ce résultat quoique faible suscite des interpellations.

Tout d'abord aux responsables du programme national de lutte contre le SIDA et aux gestionnaires des centres de dépistage, nous recommandons que les centres de dépistages soient approvisionnés en tests dont la capacité à dépister les souches virales du groupe O a été établie. De plus nous souhaiterions que toute réactivité paradoxale au Western blot fasse désormais l'objet de recherche complémentaire pour la mise en évidence des souches du groupe O.

Nous souhaiterions également qu'il soit régulièrement organisé des séminaires de recyclage pour les techniciens de laboratoire chargés des manipulations. En vue de les tenir constamment informés des nouvelles techniques de dépistage, des travaux sur les variants du VIH et leurs implications sur les modes de dépistage.

Au niveau des centres de dépistage de l'hôpital du point « G » et de l'INRSP, nous suggérons qu'il soit procédé à une amélioration, voire une informatisation du système de collecte des données sur les échantillons de sérums traités, et la mise sur pied au sein de ces structures de véritable sérothèque. De plus nous souhaiterions que ces structures soient régulièrement approvisionnées en réactifs et équipées d'outils permettant l'étude des génomes des virus (PCR et séquençage des acides nucléiques).

Pour une meilleure connaissance des souches virales présentes au Mali, nous aimerions que ce travail pionnier soit suivi d'autres études moléculaires des VIH, en vue de déterminer les souches virales présentes et de dresser un arbre phylogénique des VIH-1 et VIH-2 présents au Mali afin d'initier les travaux de recherche d'un vaccin utilisable au Mali.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1- ABIMIKU, A.; STERN, L.; ZWANIDOR, A.; MARKHAM, P.; CALEF, C.; KYARI, S.; SAXINGER, W.; GALLO, R.; ROBERT-GUROFF; REITZ, M. S.  
Subgroup GHIV type 1 Isolates from Nigeria.  
AIDS Research and human retroviruses, 1994, 10, (11), 1581-1583.
- 2- AGNES, C.; MONTAGNIER, L.; EMERMAN, M.  
Single amino-acid changes in HIV envelope affect viral tropism and receptor binding.  
Letter to nature, 1989, 340, 571-574.
- 3- ANONYME  
Relève épidémiologique hebdomadaire  
OMS, 48, 1989, 1.
- 4- ANONYME  
Relève épidémiologique hebdomadaire.  
OMS, 23, 1991, 1.
- 5- ANONYME  
HIV type 1 variation in World Health Organization-sponsored vaccine. Evaluation sites: genetic screening, sequence analysis, and preliminary biological.  
Characterization of selected viral strains.  
AIDS Research and human retroviruses, 1994, 10 (11): 1327-1343.
- 6- ANONYME  
Relève épidémiologique hebdomadaire.  
OMS, 27, 1995, 4.
- 7- SPIRE, B.; SIRE, J.  
Biologie moléculaire du virus HIV. In Sida 1989.  
M Azonlay, F. Barré-Sinoussi; J.C. Cheimann, R. Heurion J.P. Levy (Eds) Inserm, Paris, 1989, 19-25.
- 8- SPIRE, B.; HIRSCH, I.; NEUNEUT, C.; SIRE, J.; CHERMANN, J. C.  
The Env variability IS not directly related to the high cytopathogenicity of an HIV-1 variant.  
Virology, 1990, 177, 756-758.
- 9- CHOU-PONG, P.; MAMIKO, K.; DEBRA, L.; HOLLLOMAN, C.; CHI-CHENG, L.; MARCIA, L.; GERALD, S.; BOB, B.; RICHARD, J.; W.N.H.I.C.  
Antigenic variation and serotyping of HIV type 1 from four world health organization sponsored HIV vaccine sites.  
AIDS Research and human retrovirus, 1994, 10, (11).
- 10- CHARLES, S.; ZEKENG, L.; CHOU-POUG, P.; DALE, H.; KAPTUE, L.; LUZT, G.; TIMOTHY, D.; STAGUE, J. M.; SCHOCHETMAN, HAROLD, J.; RICHARD, J.  
Sensitivity of limited states HIV antibody tests for detection of HIV-1 group O infections.  
Lancet, 1994, 344, 1333-1334.

- 11- DOUGLAS, L. al.  
Characterization of HIV isolates arising after prolonged zidovudine therapy.  
*Journal of AIDS*, 1992, 5 (8), 749-759.
- 12- DIARRA, L.  
Rapport OMS de surveillance du SIDA au Mali. 1992.
- 13- ERIC, D.; BELINGA, H.; GERARLD, L.  
Heteroduplex Mobility Analysis HIV-1 Env  
Subtyping kit. Protocol version 3, 1995.
- 14- DENIS, F.; MBOUP, S.; SANGARE, A.; LEONARD, G.; VERDIER, M.; RANGER, S.  
Les virus de l'immunodéficience humaine structure, organisation génétique replication. In Sida infection à VIH aspect en zone tropicale, M. Rosennein, Itoua N. (Eds). *Médecine Tropicale*, 1989, 12-33.
- 15- FOLCRAND, G.  
Synthèse d'oligonuclotides dimériques, 2', 5' oligoadenylate d'anomerie alpha et L-oligodoxynuclotides.  
Thèse chim. org./Univ Montpellier, 2, 1992.
- 16- DE WOLF, F.; al.  
Syncytium - Inducing and Non syncytium Inducing capacity of human Immunodeficiency virus type 1 subtypes other than B: Phenotypic and genotypic characteristic.  
*AIDS Research and human retroviruses*, 1994, 10 (11), 1387-1400.
- 17- FEN, G.; LING, Y.; DAVID, L.; SHERRI, C.; HUXIONG, H.; ROBERT, J.; ALFRED, E.; THOMAS, W.; DAVID, H.; GEORGE, H.; SHARP, P.; HAHN, B.  
genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology.  
*Journal of virology*, 1994, 68 (11), 7433-7447.
- 18- FEN, G.; LING, Y.; CRAIG, S.; THORNTON, C.; DAVID, L.; McCUTCHAN, F.; BRADAC, A.; SHARP, P.; HAHN, B.; WNHIC  
genetic variation of HIV type 1 in four world health organization sponsored vaccine evaluation sites: generation of functional envelope (glycoproteine 160) clones representative of sequence subtypes A, B, C and E.  
*AIDS research and human retroviruses*, 1994, 10 (11), 1359, 1368.
- 19- FANTINI, J.; YAHI, N.  
Le Galactosyl ceramide: un nouveau recepteur pour virus de l'immunodéficience humaine .  
*Médecine scienc.* 1993, 9, (8), 891-900.
- 20- SIMON, F.; LY, T. D.; BAILLOU-BEAUFILS, A.; SCHNEIDER-FAUVEAU, V.; SAINT-MARTIN, J.; LOUSSERT-AJAKA, I.; CHAIY, M.; SARAGOSTI, S.; COUROUCE, A.; INGRAND, D.; JANOT, C.; BRUN-VEZINET, F.  
Sensibilité des trousse de dépistage pour la détection des anticorps anti-HIV-1 sous-type O.  
*Rev. Fr. des lab*, 1994, 266, 4.

- 21- GAO, Q.; GU, Z.; PARNIAK, M.; LIX et coll.  
 I vitro selection of variants of human immunodeficiency virus type 1 resistant to 2', 3' dideoxythymidine and 2', 3' dideoxyinosine.  
 J; Virol, 1992, 66, 12-19.
- 22- GERALD, M.  
 tenth anniversary perspectives on AIDS.  
 AIDS Research and human retroviruses, 1994, 10 (11), 1317-1324.
- 23-SCHMIDTMAYEROVA, H.; GAYET, O.; GUETTARI, N.; BOLMONT, C.; HIRSCH, I.; CHERMANN, J. C.  
 Characterization of HIV-1-Par, a macrophage tropic strain: cell tropism, virus/cell entry and nucleotide sequence of the envelope glycoprotein.  
 Res virol, 1993, 144, 21-26.
- 24- LOUSSERT-AJAKA, I.; LY, T.D.; CHAIX, M.; INGRAND, D.; SARAGOSTI, S.; COUROUCE, A.; BRUN-VEZINET, F.; SIMON, F.  
 HIV-1/HIV-2 seronegativity in HIV-1 subtype O infected patients.  
 Lancet, 1994, 343, 1393-1394.
- 25- LOUSSET-AJAKA, I.; CHAIX, M.; BETTE, K. et coll.  
 Variability of human immunodeficiency virus type 1 Group O strains isolated from camerounian patients living in France.  
 J; virol, 1995, 69 (10), 5640-5649.
- 26- ISABELLE, M.; BAUMBERGER, C.; YERLY, S.; PERRIN, L.  
 V3 sequens in primary HIV-1 infection.  
 AIDS, 1995, 9, 11-17.
- 27- DELAGNEAU, J. F.; CHENEBAUX, D.  
 La detection du virus du Sida: in le Sida.  
 MONTAGNIER, L.; GALLO, R.; (Eds) pour la Science, Paris, 1989, 88-98.
- 28- LERY, J. P.  
 Traitements du Sida: recherche de nouveaux médicaments et élaboration de thérapies géniques.  
 Médecine/Sciences, 1991, 7, 830-841.
- 29- JOSE, C.; WOUTER, J.; HEYNDRIKX, L. et coll.  
 genetic and antigenetic variability of HIV type 1 in Braşil.  
 AIDS research and human retroviruses, 1994, 10 (9), 1157-1163.
- 30- J. N. NKENGASONG, JANSSENS, W.; HEYNDRIKX, L. et coll.  
 Genetic subtypes of HIV-1 in cameroun.  
 AIDS 1994, 8, 1405-1412.
- 31- J. N. NKENGASONG, MARTINE, P.; NDUMDE, P. et coll.  
 croos N entratizing antibodies to HIV-1 Ant70 and HIV-1 IIIB in sero of african and Belgium. HIV-1 infected individuals.  
 AID, 1994, 8, 1089-1096.

- 32- J. N. TOURNER, B. VERRIER, F. BIRON, B. MANDRAND, D. PEYRAMOND.  
Variants du virus de l'immunodéficience humaine type 1.  
*Méd Mal infect*, 1995, 25, 709-75.
- 33- J. P. MOORE, P. RARA  
The role of the V3 loop of gp120 in HIV infection.  
*AIDS*, 1991, 5, 21-33.
- 34- KELLAM, P.; BOUCHER, C.; LARDE, B.  
Fifth mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase contributes to zidovadine.  
*Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89, 1934-1938.
- 35- KALISH, M.; CHI-CHENG, L.; BRUCE, G. et coll.  
Early HIV type 1 strains in Thailand were not responsible for the current epidemic.  
*AIDS Research and human retroviruses*, 1994, 10, (11), 1573-1575.
- 36- LAROSA, G. J.; DAVIDE, J.; WEINHOLD, K.  
Conserved sequence and structural elements in the HIV-1 principal neutralizing determinant.  
*Sciences*, 1990, 249, 932-935.
- 37- LUZT, G.; PETER, H.; EBERLE, J.  
A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon.  
*Journal of virology* 1994, 68 (3): 1581-1585.
- 38- M. ALIZON, F. CLAVEL  
Les VIH: de la découverte à leur analyse moléculaire. In *Sida et infection par le VIH*. L. MONTAGNIER, W. ROZEMBAUM, J. C. GLUCKMAN (Eds) *Medecine-Sciences Flammarion*, Paris, 1989, 91-107.
- 39- MARLEEN, V.; DECOURT, J. L.; ROBERT, D. et coll.  
Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate.  
*Jr Virol*, 1994, 68, (3), 1586-1596.
- 40- MARTINE, P.; J. NKENGASONG; BETTY, W. et coll.  
Antibodies to V3 loop peptides derived from chimpanzee lentiviruses and the divergent HIV-1 Ant70 isolate in human sera from different geographic regions.  
*AIDS*, 1994, 8, 1657-1661.
- 41- MARTINE, P.; GAYE, A.; MBOUP, S. et coll.  
Presence of HIV-1 group O infection in West Africa.  
Projet Sida, Laboratoire retrovirus, ORSTOM, Montpellier, France.
- 42- MITSUYA, H.; BRODER, S.  
Inhibition of the in vitro infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III lymphadenopathy associated virus (HTLV III/LAV) by 2', 3' dideoxynucleosides  
*Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83, 1911-1915.

- 43- MULANGA, C.; EKA, E.; EKO, E.  
Evidence for HIV-1 group of infection in Nigeria.  
*Lancet*, 1995, 346-306
- 44- P. CHARNEAU; ANDREW, M.; QUILLEN, C. et coll.  
Isolation and envelope sequence of a highly divergent HIV-1 Isolate definition of a New HIV-1 group.  
*Virology*, 1994, 205, 247-253.
- 45- P. WESTERVELT, HOWARD, E.; LEC, R.  
Identification of a determinant within the human immunodeficiency virus 1 surface envelope glycoprotein critical for productive infection of primary monocytes.  
*Medical Sciences*, 1991, 88, 3097-3101.
- 46- P. WESTERVELT, TROMBRIDGE, D.; LEON, G. et coll.  
Macrophage tropism determinants of human immunodeficiency virus type 1 in vivo.  
*Journal of virology*, 1992, 66 (4), 2577-2582.
- 47- RACHANEE, C.; LISTER, S.; CALLON, D.; PONTIANO, K.; DEDDOWS, S.; WERBER, J. W.N.H.I.C.  
Serotyping HIV type 1 by antibody binding to the V3 loop: relation ship to viral genotype.  
*AIDS research and human retroviruses*, 1994, 10 (11), 1379-1386.
- 48- R. CHEYNIER  
Variabilité génétique du VIH-1.  
*Semaine des hôpitaux*, 1991, 36, 1635-1638.
- 49- R. GALLO; L. MONTAGNIER  
Le Sida aujourd'hui. In le Sida .  
L. Montagnier, R. Gallo (Eds) Bibliothèque pour la science, Paris, 1989, 6-18.
- 50- ROBERT, D.; BART, V.; MARLEEN, V. et coll.  
Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west central african origin.  
*Journal of virol*, 1990, 64 (3), 1207-1216.
- 51- ROBERT, R.; DONALD, B.  
Les manifestations cliniques du Sida. In le Sida, L. MONTAGNIER, R. GALLOT (Eds), Bibliothèque pour la science, Paris, 1989, 67-76.
- 52- ROBERT, Y.; HIROAKI, M.; SAMUEL, B.  
Les traitements du Sida. In le Sida  
L. Montagnier, R. Gallo (Eds) Bibliothèque pour la science, Paris, 1989, 99-112.
- 53- RONALD, R.; MICHEL, T.; LALANDE, C.; PARNIAK, M.; MARC, A.  
Isolement de souches HIV-1 résistantes à l'AZT limites des analogues de nucléosides dans la chimiothérapie du Sida.  
*Médecine/Sciences*, 1991, 7, 118-126.

- 54- SALADIN, O.; HEYWARD, W.; JOSE, E.  
The world health organization Net work for HIV Isolation and characterization: summary of a pilot study.  
AIDS research and retroviruses, 1994, 10 (11),1325-1326.
- 55- SHARP, P.; ROBERTSON, D.; FENG, G.; BEATRICE, H.  
Origins and diversity of human immunodeficiency viruses:  
AIDS, 1994, 8, 27-42.
- 56- SHIODAT, T.; LEVY, J.; CHENG, M.  
Small amino acid changes in the V3 hypervariable region of gp 120 can affect the T-cell-line and macrophage tropism of human, immunodeficiency virus type 1.  
Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89, 9434-9438.
- 57- SIMMONDS, P.; BALFE, P.; LUDLAM, C. et coll.  
Analysis of sequence diversity in hypervariable regions of the external glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1.  
J. Virol, 1990, 64, 5840-5850.
- 58- STEPHEN, S.; TERENCE, J.; KIM, H.; BRYAN, R.  
Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of celle tropism in HIV-1.  
Sciences, 1991, 253, 71-74
- 59- TOM, F.; ZWART, G.; BAKKER, M. et coll.  
Naturally occuring. Mutations within HIV-1 V3 genomic RNA lead to antigenetic. Variation dependant on a single amino acid substitution.  
Virology, 1991, 185 (1), 195-205.
- 60- TOURE, Zeina  
Etude de la séroprévalence des infections dues au VIH au Mali.  
Thèse Médecine, Bamako, 1993.
- 61- VARTANIAN, J.  
Variabilité du virus de l'immunodéficience humaine de type-1: de la diversité des Isolats aux mécanismes moléculaires.  
Thèse microbiologie/UNIV, Paris7, 1992.
- 62- WILLY, R.  
L'histoire du Sida. In le Sida en question.  
F. BARRE-SINOUSI, J. C. CHERMANN, WROZEMBAUM (Eds) Plon, Paris, 1987, 16-22.
- 63- WILIAM, H.; FLOSSIE, W. S.  
L génétique du virus du Sida. In le Sida.  
L. MONTAGNIER, R. GALLOT (Eds) Bibliothèque pour la science, Paris, 1989, 19-32.
- 64- W. JANSSEN, HEYNDRIKX, L.; FRANSEN, K. et coll.  
Genetic and phylogenetic analysis of Env subtypes genetic and phylogenetic analysis of Env sutypes G and H in central Africa.  
AIDS research and human retroviruses, 1994, 10 (11), 877-879.



65-YOU, B.

Le diagnostic de l'infection pour les virus de l'immunodéficience humaine HIV-1 et HIV-2. Par la technique de polymérase chain réaction (PCR).

Document Institut Pasteur de Bangui.

66- ZEKENG, L.; GURTLER, L.; AFANE, E. et coll.

Prévalence of HIV-1 subtype O infection in cameroon: preliminary results.

AIDS, 1994,8 (11), 1626-1628.

**NOM: ELOUNDOU NKA**

**PRENOM: Henri**

**TITRE de la THESE: PREVALENCE DU VIH-1 GROUPE O AU MALI: RESULTATS PRELIMINAIRES**

**ANNEE : 1995-1996**

**VILLE de SOUTENANCE: BAMAKO**

**PAYS D'ORIGINE: MALI**

**LIEU de DEPOT: BIBLIOTHEQUE Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie**

**SECTEUR D'INTERET: MICROBIOLOGIE, VIROLOGIE, SANTE PUBLIQUE**

**Resumé:**

Nous avons entrepris une étude dont l'objectif était de rechercher et de déterminer la prévalence du VIH-1 groupe O au Mali.

L'échantillon de travail était composé de 303 sérums provenant de toutes les régions du pays. La série comprenait 198 sérums VIH-1, 33 sérums VIH-1+2, 72 sérums VIH (-) prélevés chez des prostituées (sujets à risque).

Les travaux de recherche pratique se sont déroulés en deux étapes. Une étape de dépistage au cours de laquelle tous les sérums ont été traités à Innostest groupe O (Innogénétic, Belgium). Une étape de confirmation au cours de laquelle les sérums réactifs à Innostest étaient répris à l'Inno-lia (Innogénetic, belgium).

8 sérums ont été réactifs à Innostest. A la confirmation 1 seul a été réactif. Cependant le profil génétique et antigénique du virus infectant ce sérum n'était pas celui d'une souche du groupe O normale.

Nous avons déterminé que le VIH-1 groupe O est présent à 0,5% parmi les 198 sérums VIH-1 de notre échantillon de travail.

**MOTS-CLES: VIH-1, Groupe O, Variabilité génétique, Prévalence, Mali.**

# SERMENT DE GALIEN

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

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

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

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

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

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

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