

Ministère de l'Education Nationale
Université de Bamako

République du Mali
Un Peuple-Un But-Une Foi



Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie
(FMPOS)



Année académique : 2005-2006

No.....

VARIABILITE GENETIQUE DU SYSTEME HLA APRES STIMULATION PAR DES EPITOPES DU VIH-1

Présentée et soutenue publiquement le Juillet 2006

Par M^{lle} SEYDOU GAOH Hadiza

En vue de l'obtention du grade de Docteur en Pharmacie
(Diplôme d'Etat)



Président: Professeur Anatole TOUNKARA

Membre: Professeur Saharé FONGORO

Membre: Docteur Baby MOUNIROU

Directeur de Thèse: Docteur Ousmane KOITA

Les travaux ont été réalisés au Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée/Université de Bamako avec le soutien de Brown University, du NIAD/NIH et de Campbell Foundation

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

ANNEE UNIVERSITAIRE 2005-2006

ADMINISTRATION

<u>DOYEN:</u>	Anatole TOUNKARA Professeur
<u>1^{er} ASSESSEUR :</u>	Drissa DIALLO MAITRE DE CONFERENCES AGREGÉ
<u>2^{ème} ASSESSEUR :</u>	Sékou SIDIBE MAITRE DE CONFERENCES
<u>SECRETAIRE PRINCIPAL :</u>	Yénimegue Albert DEMBELE Professeur
<u>AGENT COMPTABLE :</u>	Mme COULIBALY Fatoumata TALL CONTROLEUR DES FINANCES

PROFESSEURS HONORAIRES

Mr Alou BA	Ophthalmologie
Mr Bocar SALL	Orthopédie – Traumatologie - Secourisme
Mr Souleymane SANGARE	Pneumo-phtisiologie
Mr Yaya FOFANA	Hématologie
Mr Mamadou L. TRAORE	Chirurgie Générale
Mr Balla COULIBALY	Pédiatrie
Mr Mamadou DEMBELE	Chirurgie Générale
Mr Mamadou KOUMARE	Pharmacognosie
Mr Ali Nouhoum DIALLO	Médecine interne
Mr Aly GUINDO	Gastro-entérologie

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

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

1. PROFESSEURS

Mr Abdel Karim KOUMARE	Chirurgie Générale
Mr Sambou SOUMARE	Chirurgie Générale
Mr Abdou Alassane TOURE	Orthopédie -Traumatologie, Chef de D.E.R.
Mr Kalilou OUATTARA	Urologie
Mr Amadou DOLO	Gynéco Obstétrique
Mr Alhousseini Ag MOHAMED	ORL
Mme SY Assitan SOW	Gynéco-Obstétrique
Mr Salif DIAKITE	Gynéco-Obstétrique
Mr Abdoulaye DIALLO	Anesthésie-Réanimation

2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

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

3. MAITRES DE CONFERENCES

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

4. MAÎTRES ASSISTANTS

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

5. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

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

▪ D.E.R. DE SCIENCES FONDAMENTALES

1. PROFESSEURS

Mr Daouda DIALLO	Chimie Générale & Minérale
------------------	----------------------------

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

2. MAÎTRES DE CONFERENCES AGREGES

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

3. MAÎTRES DE CONFERENCES

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

4. MAÎTRES ASSISTANTS

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

5. ASSISTANTS

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

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

1. PROFESSEURS

Mr Abdoulaye Ag RHALY	Médecine Interne
-----------------------	------------------

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

2. MAÎTRES DE CONFERENCES AGREGES

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

3. MAITRES DE CONFERENCES

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

4. MAITRES ASSISTANTS

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

5. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Mr Kassoum SANOGO	Cardiologie
Mr Seydou DIAKITE	Cardiologie
Mr Mahamadou B. CISSE	Pédiatrie
Mr Arouna TOGORA	Psychiatrie
Mme Diarra Assétou SOUCKO	Médecine interne
Mr Boubacar TOGO	Pédiatrie
Mr Mahamadou TOURE	Radiologie
Mr Idrissa A. CISSE	Dermatologie
Mr Mamadou B. DIARRA	Cardiologie
Mr Anselme KONATE	Hépatogastro-entérologie
Mr Moussa T. DIARRA	Hépatogastro-entérologie
Mr Souleymane DIALLO	Pneumologie
Mr Souleymane COULIBALY	Psychologie
Mr Sounkalo DAO	Maladies infectieuses
Mr Cheick Oumar Guinto	Neurologie

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

1. PROFESSEURS

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

2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Drissa DIALLO	Matières médicales
Mr Ousmane DOUMBIA	Pharmacie Chimique

3. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Boulkassoum Haidara	Législation
Mr Elimane MARIKO	Pharmacologie

4. MAÎTRES ASSISTANTS

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

5. ASSISTANTS

Mr Saibou MAIGA	Législation
Mr Ousmane KOITA	Parasitologie Moléculaire

D.E.R. SANTE PUBLIQUE

1. PROFESSEUR

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

2. MAÎTRE DE CONFERENCES AGREGE

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

3. MAÎTRES ASSISTANTS

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

4. ASSISTANTS

Mr Samba DIOP	Anthropologie Médicale
Mr Seydou DOUMBIA	Epidémiologie
Mr Oumar THIERO	Biostatistique

▪ **CHARGES DE COURS & ENSEIGNANTS VACATAIRES**

Mr N’Golo DIARRA	Botanique
Mr Boubou DIARRA	Bactériologie
Mr Salikou SANOGO	Physique
Mr Boubacar KANTE	Galénique
Mr Souleymane GUINDO	Gestion
Mme DEMBELE Sira DIARRA	Mathématiques
Mr Modibo DIARRA	Nutrition
Mme MAÏGA Fatoumata SOKONA	Hygiène du Milieu
Mr Mahamadou TRAORE	Génétique
Mr Yaya COULIBALY	Législation
Mr Lassine SIDIBE	Chimie-Organique

▪ **ENSEIGNANTS EN MISSION**

Pr. Doudou BA	Bromatologie
Pr. Babacar FAYE	Pharmacodynamie
Pr. Eric PICHARD	Pathologie Infectieuse
Pr. Mounirou CISSE	Hydrologie
Pr. Amadou Papa DIOP	Biochimie

DEDICACES

REMERCIEMENTS

Dédicaces

A ALLAH, le tout puissant, le tout méricordieux le très méricordieux

« Notre Seigneur ! Parachève notre lumière. Pardonne nous. Tu es puissant sur toute chose »

A mes parents : papa Hubert et maman Roumanatou

Je suis fier d'avoir reçu de vous une éducation de qualité. La patience et la tolérance ont toujours fait de vous des parents de famille modèle.

En m'inclinant devant vous en signe de reconnaissance, de dévouement et d'entière soumission ; je vous présente mes excuses et demande votre bénédiction qui ne m'ont d'ailleurs jamais manqué.

Que ce modeste travail, fruit de votre engagement, me rende digne de vous et que Dieu tout puissant vous donne joie et encore longue vie.

A ma seconde mère Aminata Bako

A mes sœurs et frères : A vous j'ai eu la lourde responsabilité de montrer le bon exemple. Vous m'avez respecté avec tout l'honneur du à une aînée et écouter mes humbles conseils. En ce jour mémorable je vous invite à renforcer nos liens, au courage dans les études et vous remercie de tout le soutien que vous m'avez apporté. Je vous aime.

Aux familles Laoual TAWAYE, Djibo AGIYA

REMERCIEMENTS

Au peuple malien qui m'a accueilli et surtout instruit

A mes oncles et tantes pour le soutien et l'encouragement

A la famille Sylla trouvez ici toute ma gratitude

A l'ensemble du personnel du LBMA pour leur bonne humeur et leurs compétences

Au Dr Dabitaou Djénéba pour votre assistance et vos conseils. Identifiez vous à ce travail qui n'aurait pris cette forme sans votre apport.

Au Dr Ibrah pour votre encadrement et votre indéfectible soutien

A mes amies : Ramatou Falkié, Rakia Ousmane, Adiza Amadou, Mariama Sidi, Rahila Zakari, Rachida Souley, Arima Ousmane, Aicha Mati, Amina zoumari, Fanata El Hadj Ibrahim, Nafissa Kouka.

En souvenir des heureux moments et de longues années passées ensemble qui nous a permis de tester des liens d'amitié profonde. Recevez ici l'expression de ma fidèle amitié.

A mes amis Maurice Assogba, Edmond Alloké, Ousmane Maiga, Ayouba Diarra, Mamane Sani Gagara

A mes cousins Habibou Gonabi, Yacouba Issa Serki, Souleymane Issa Serki

A mes collègues de promotion de thèse : Karim Coulibaly, Penda Thiam, Aissata Cissé, Cheick Dembélé, Zibo Diawara, Ousmane Cissé.

Les durs moments que nous avons passés ensemble ont été forts enrichissants pour nous tous. Puisse l'ensemble de l'enseignement reçu nous guide dans notre vie active.

A mes cadets (tes) : Yves Diatta, Mourtala Neino, Abdoulaye Dicko, Nafissa H. Souley, Salima Kabaou, Hadiza Soumana, Aichatou Anafi, Mariama Zoumari, Zeinabou Saley, Amina Yacouba.

A toute la communauté nigérienne au MALI

HOMMAGES
AUX
MEMBRES DU JURY

A notre maître et président du jury

Le Professeur Anatole TOUNKARA

- **Professeur agrégé d'immunologie**
- **Chef de DER de sciences Fondamentales de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie**
- **Directeur du programme de recherche NIAID/NIH/FMPOS sur le SIDA et la tuberculose**
- **Doyen de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie.**

Honorable maître, vous avez bien voulu prendre ce modeste travail sous le patronage de votre haute autorité, en acceptant la présidence de notre thèse ; nous vous prions d'agréer nos plus vifs remerciements et de croire qu'un tel honneur sera la meilleure récompense de nos peines.

Recevez cher maître, l'expression de notre profonde gratitude.

A notre maître et juge

Le Professeur Saharé FONGORO

- **Maître de conférence en néphrologie**
- **Chef de service de néphrologie et d'hémodialyse du CHU du point G**

Cher maître, en acceptant d'apprécier ce modeste travail, vous contribuez à son indispensable amélioration. Recevez l'expression de nos respectueux hommages.

A notre maître et juge

Docteur Baby MOUNIROU

- **Maître assistant d'hématologie à la *Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie.***
- **Directeur général du *Centre National de Transfusion Sanguine***
- **Superviseur du *laboratoire de biologie clinique des essais de vaccin anti-paludique au Malaria Research and Training Center (MRTC)***

Nous sommes très honorés de la spontanéité avec laquelle, vous avez accepté de juger ce travail. Des nos premiers cours d'hématologie nous avons été marqué, par la simplicité, l'élégance avec lesquelles vous dispensez les cours. La qualité même de ces cours font de vous un grand maître à respecter et à imiter.

Recevez cher maître, l'expression de notre profonde gratitude.

A notre maître et directeur de thèse

Docteur Ousmane KOITA

- ***PhD en Biologie Moléculaire Parasitaire***
- ***Responsable du laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée de la Faculté des Sciences et Techniques (FAST)***
- ***Directeur adjoint du programme de recherche NIAID/NIH/FMPOS sur le SIDA et la tuberculose***

Cher maître, Nous ne saurons oublier l'intérêt que vous avez porté à notre formation. Vos qualités intellectuelles et votre rigueur scientifique que votre discrétion masque si bien nous ont marqué. Nous tenons à vous exprimer notre reconnaissance pour les conseils prodigués tout au long de la réalisation de ce travail de thèse, tout en nous laissant suffisamment de latitude dans la conduite de notre travail.

Notre reconnaissance ne se bornera pas à ces quelques mots de remerciements.

Soyez assuré cher maître de notre profonde gratitude.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADCC :	Cytotoxicité Dépendante des Anticorps
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ANRS :	Agence Nationale de Recherche sur le SIDA
ARN :	Acide Ribonucléique
ARNt :	Acide Ribonucléique de transfert
ARV:	Antirétroviraux
BCG:	Bacille de Calmette- Guérin
CD:	Cluster of Differentiation
CDC:	Center for diseases Control and prevention
CMH:	Compexe Majeur d'Histocompatibilité
CLIP:	Class-II associated Invariant chain Peptide
CPA :	Cellule Presentatrice de Antigène
CRF :	Forme Recombinante en circulation
CTL :	Lymphocyte T Cytotoxique
EDSM-II :	Enquête Démographique de Santé au Mali
ELISA :	Enzyme Linked Immunosorbant Assay
ELI Spot :	Enzyme Linked Immunospot
GAIA:	Global Action to Immunize against AIDS
GP:	Glycoprotéines
HLA:	Human Leucocyte Antigen
HTLV :	Human T-cell Leukemia Virus
IFI :	Immunofluorescence Indirecte
IL :	Interleukine
IMAAR :	Initiative Malienne d'Accès aux Antirétroviraux
INNT :	Inhibiteur Non Nucléosidique de la Transcriptase Inverse
INRT :	Inhibiteur Nucléosidique et nucléotidique de la Transcriptase inverse
IP :	Inhibiteur de la Protéase
IST :	Infection Sexuellement Transmissible
LMP :	Large Multifunctional Protease
LTNP:	Long Term Non Progressor
LTR :	Long Terminal Repeat
MVA:	Modified Vaccinia Virus Ankara
OMS :	Organisation Mondiale de la Sante
PBMC :	Cellules Mononuclées du Sang Périphériques
RIPA :	Radioimmunoprécipitation

SIDA :	Syndrome d'Immunodéficience Acquise
SHIV:	Simian/Human Immunodeficiency Virus
SIV:	Simian Immunodeficiency Virus
TAP:	Transporter Associated with Antigen Processing
TNF:	Tumor Necrosis Factor
VIH:	Virus de l'Immunodéficience Humaine
WB:	western Blot

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	<u>P1</u>
OBJECTIFS	<u>P3</u>
1-GENERALITES	<u>P4</u>
1-1 DEFINITION DES RETROVIRUS	<u>P4</u>
1-2 CARACTERES GENERAUX (9).....	<u>P4</u>
1-3 CLASSIFICATION DES RETROVIRUS	<u>P4</u>
1-4 BIOLOGIE	<u>P5</u>
1-5 PHYSIOPATHOLOGIE	<u>P14</u>
1-6 EPIDEMIOLOGIE.....	<u>P20</u>
1-7 LE SYSTEME HLA	<u>P22</u>
1-8 - METHODES DE DIAGNOSTIC DU VIH	<u>P34</u>
1-9 TRANSMISSION DU VIH	<u>P40</u>
1-10 PREVENTION	<u>P40</u>
1-11 LES ANTIRETROVIRAUX.....	<u>P41</u>
1-12 APPROCHES VACCINALES	<u>P43</u>
2- MATERIELS ET METHODES	<u>P52</u>
2-1 LIEUX D'ETUDE :	<u>P52</u>
2-2 TYPE ET PERIODE D'ETUDE	<u>P53</u>
2-3 POPULATION D'ETUDE.....	<u>P54</u>
2-4 PREPARATION DES ECHANTILLONS AU CNTS.....	<u>P54</u>
2-5 TRANSPORT DES ECHANTILLONS AU LBMA	<u>P54</u>
2-6 CRITERES D'ACCEPTABILITE DE L'ECHANTILLON	<u>P55</u>
2-7 BONNES PRATIQUES DE LABORATOIRE	<u>P55</u>
2-8 TECHNIQUE DE LYMPHOSEPARATION	<u>P55</u>
2-9 ENZYME LINKED IMMUNOSPOT (ELISPOT).....	<u>P57</u>
2-10 TYPAGE HLA	<u>P60</u>
2-11. CONSIDERATIONS ETHIQUES.....	<u>P66</u>
3- RESULTATS	<u>P67</u>
4- DISCUSSION	<u>P79</u>
5- CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	<u>P83</u>
6- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	<u>P84</u>

INTRODUCTION

Depuis la déclaration des premiers cas d'infection à VIH et SIDA au début des années 80, le VIH est reconnu comme l'un des agents infectieux les plus importants. C'est un rétrovirus à ARN (acide ribonucléique) appartenant à la sous famille des lentivirus. Deux types de VIH ont été identifiés : le VIH-1 le plus répandu dans le monde et le

VIH-2 se rencontrant principalement en Afrique occidentale (1).

L'épidémie du VIH/SIDA est un problème de santé publique qui continue de progresser à travers le monde. La tranche d'âge la plus touchée est, en effet, celle qui regroupe les adultes en pleine période de productivité. Plus encore, l'infection à VIH a ruiné des décennies de lutte antituberculeuse par l'accroissement de son incidence chez les immunodéprimés.

Selon le rapport récent de l'OMS, on estime à 40,3 millions le nombre de personnes vivant avec le VIH/SIDA fin 2005 (2). Dans la même année, près de 4,9 millions de personnes ont été infectées, dont 2,3 millions sont des enfants de moins de 15 ans. Plus de 95% des personnes infectées étaient dans les pays à revenu faible ou moyen (2).

Dans la plupart des pays industrialisés, et notamment aux Etats-Unis, en Australie, et en Europe du nord, le nombre de nouveau cas a diminué où s'est stabilisé au cours de ces dernières années. Par contre l'épidémie progresse rapidement en Chine et en Inde, sans épargner l'Europe de l'est et la Russie, ainsi que l'Amérique Latine et les Caraïbes (3).

L'Afrique subsaharienne avec 25,8 millions de personnes vivant avec le VIH/SIDA demeure la région la plus touchée et représente les 2/3 de porteurs de virus dans le monde (2).

L'Afrique australe a une prévalence qui dépasse 25% avec plus de 30% chez les femmes enceintes (3).

En Afrique de l'ouest, la région la moins touchée, la prévalence ne dépasse pas 1% dans certains pays (Mauritanie, Niger, Sénégal).

Au Mali, la prévalence globale estimée selon la troisième enquête démographique et de santé du Mali (EDSM-III) de décembre 2001 est de 1,7%, les femmes sont les plus touchées avec une prévalence globale de 2% contre 1,3% chez les hommes (4).

Soureya dans une étude rétrospective de 1993 à 1999 faite au CNTS rapporte une prévalence de 3% dans la population de Bamako (5).

Dans les pays en voie de développement, la disponibilité des médicaments contre le VIH est limitée et les taux d'infection et de mortalité continuent de s'accroître à un rythme alarmant. Récemment des efforts sont faits ou sont en cours pour rendre les médicaments plus accessibles. Mais la conséquence de l'utilisation des médicaments à grande échelle serait la sélection et la propagation des souches résistantes aux ARVs. Ainsi le vaccin serait la solution pour empêcher cette maladie d'être endémique. Actuellement la recherche s'oriente vers un vaccin qui serait capable de restaurer le système immunitaire afin qu'il participe au contrôle de la réplication virale et pouvoir ainsi alléger, voire même arrêter transitoirement, les traitements antirétroviraux. La mise au point d'un vaccin requiert la connaissance de la biologie du virus, les facteurs liés à l'hôte humain notamment le système du complexe majeur d'histocompatibilité. Une étude présente dans notre laboratoire qui a permis de tester les épitopes quant à leur reconnaissance par les cellules CD4 et CD8 a montré une forte proportion de sujets répondant à la stimulation des épitopes par les cellules de la Classe II. Seulement 18,18% des sujets ont répondu aux épitopes de classe I. Cette faible réponse pourrait être dû au phénomène de restriction par le Complexe Majeur d'Histocompatibilité car les épitopes utilisés pour la stimulation cellulaire ont été conçus dans le contexte de A3. Cela nous a poussé à explorer le polymorphisme génétique du système HLA de nos donneurs par la technique de PCR afin d'identifier les différents allèles de la classe I du HLA. En effet, La présentation des épitopes au système immunitaire est dépendante des molécules de reconnaissance du soi et du non soi, les molécules HLA, présentes à la surface des cellules du système immunitaire d'où l'intérêt d'explorer ce système.

OBJECTIFS

OBJECTIFS

OBJECTIF GENERAL :

Examiner la diversité génétique du système HLA après stimulation par les épitopes de classe I du VIH-1.

OBJECTIFS SPECIFIQUES :

- Identifier les allèles de classe I du système HLA chez les sujets dont les cellules T ont été stimulées par les épitopes de classe I du VIH-1.
- Identifier l'allèle HLA le plus représentatif de la population d'étude
- Etablir la relation entre la fréquence des antigènes HLA et la réponse des cellules T aux épitopes de classe I du VIH-1.

GENERALITES

1-GENERALITE

1-1 DEFINITION DES RETROVIRUS (8)

Les rétrovirus découverts en 1911 par Peyton et Rous sont des virus à acide ribonucléique (ARN), caractérisés par la présence d'une enzyme, la transcriptase inverse (TI). Cette enzyme permet de synthétiser un acide désoxyribonucléique (ADN) double brin, à partir de l'ARN viral dans la cellule infectée.

1-2 CARACTERES GENERAUX (9)

Les rétrovirus ont en commun certaines caractéristiques :

L'information génétique est portée par un ARN simple brin au lieu d'un ADN et sont les seuls virus diploïdes. Ils possèdent une enzyme : la TI, qui est une ADN-polymérase ARN dépendante permettant de synthétiser l'ADN, double brin, complémentaire de l'ARN virale, dans la cellule hôte.

Le génome est composé de l'extrémité 5' vers extrémité 3' de trois gènes caractéristiques : *gag*, *pol*, *env*. Le gène *gag* (group antigen) code pour les protéines de la nucléocapside; Le gène *pol* (polymérase) code pour les enzymes virales; Le gène *env* (enveloppe) code pour les glycoprotéines d'enveloppe. A chaque extrémité du génome existe des séquences répétées LTR (long terminal repeat). Ces séquences comprennent les signaux de régulation, d'expression des gènes du virus et d'intégration aux gènes cellulaires.

1-3 CLASSIFICATION DES RETROVIRUS (10, 11)

Les premières classifications des rétrovirus des animaux ont été fondées, sur leur implication en pathologie, leur morphologie en microscopie électronique et leur antigénicité. Plus récemment se sont ajoutés d'autres critères tels la structure du génome et la présence de certains gènes. On identifie alors trois groupes:

- Les Oncovirus qui ont un pouvoir transformant, sont les plus répandus et sont associés à des tumeurs et à des leucémies. Les virus HTLV-1 et HTLV-2 identifiés chez l'homme appartiennent à ce groupe.
- Les Lentivirus : entraînant des infections virales lentes, toujours mortelles. Ils sont connus, pour leur variabilité au sein d'un même hôte durant l'évolution de l'infection, et par la pérennité de la virémie (réplication virale constante). Le VIH est un lentivirus ; il a la capacité de se répliquer continuellement dans la cellule et d'intégrer son génome. Cette famille comprend entre autre le virus de l'immunodéficience simienne (VIS), le virus Visna du mouton et beaucoup d'autres.
- Les Spumavirus : sont identifiés chez de nombreux mammifères, non associés à aucune pathologie chez l'homme et chez l'animal. Ils ont été isolés dans les cultures cellulaires (humaines et animales) mais leur éventuelle implication pathologique n'est pas connue.

1-4 BIOLOGIE

1-4-1 STRUCTURE DU VIH-1

Les VIH sont des virus enveloppés de 90 à 120 nm de diamètre. Ils apparaissent comme ayant une forme sphérique comportant de l'extérieur vers l'intérieur une enveloppe dont la bicouche lipidique provient de la membrane cytoplasmique et se trouve hérissée de spicules glycoprotéines. Celles-ci comportent une partie interne, la gp41 ou glycoprotéine transmembranaire et une partie externe, la gp 120.

La face interne de l'enveloppe est tapissée d'une matrice protéique faite de la protéine p17. La capsid virale en forme de cône tronqué est faite de la protéine p24. A l'intérieur se trouve le génome viral (deux molécules d'ARN) et des enzymes qui sont : l'intégrase (p32), la protéase (p10) et la rétrotranscriptase (p66 et p61).

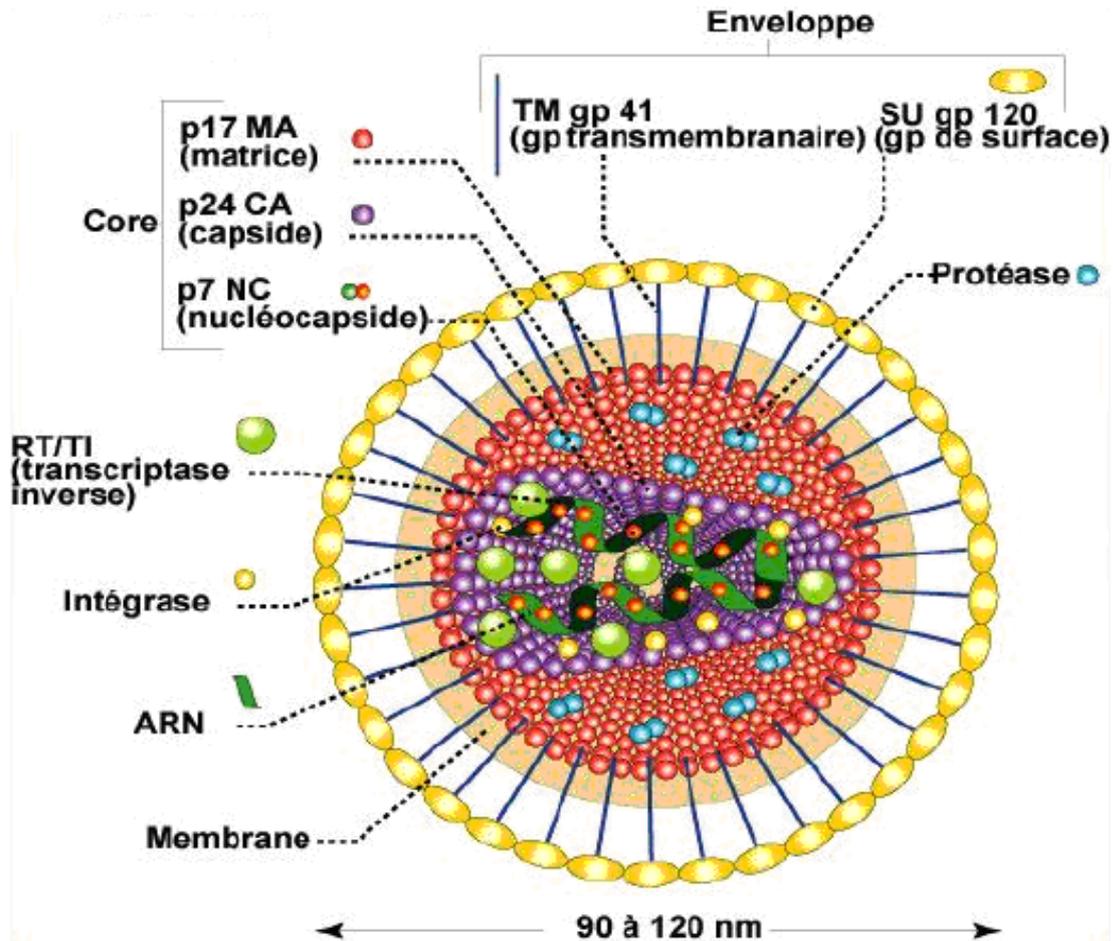


Figure 1 : Représentation de la structure du VIH-1 (12)

1-4-2 ORGANISATION GENETIQUE (10,13)

En 1984, plusieurs équipes ont réalisé le clonage moléculaire du génome du VIH-1, ce qui a permis de déterminer sa séquence nucléotidique, aboutissant à l'établissement de sa carte génétique et à la synthèse de certaines de ses protéines en laboratoire. Le génome rétroviral de VIH est encodé par une molécule d'ARN simple brin d'environ 10 Kilobases.

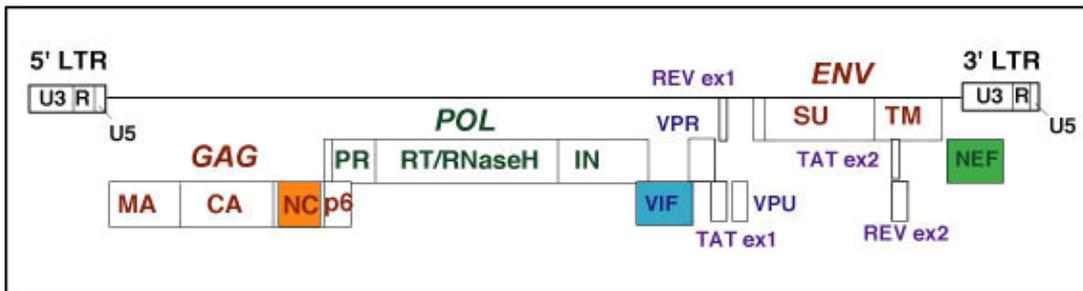


Figure 2 : Organisation générale du VIH-1 (23)

Il comprend une large région codante pour les protéines virales encadrée par deux régions non codantes constituées par : une région R (Redondant) présente aux deux extrémités et qui participe à la rétrotranscription; une région U5 qui contient des séquences pour le processus d'hybridation entre l'ARN et l'ARNt suivie d'une courte région PB (Primer Binding Site) servant d'amorce à la TI. Une même séquence de taille variable LTR (long terminal repeat) est présente à chaque extrémité de l'ADN proviral. La région codante contient principalement trois gènes rétroviraux classiques et six gènes viraux supplémentaires. Ces gènes supplémentaires sont, pour la plupart, impliqués dans des phénomènes de régulation de l'expression des protéines virales et par là même, de la multiplication du virus.

Les gènes majeurs du VIH-1 :

- Le gène *gag* (group specific antigen) est le précurseur des protéines structurales internes de tous les rétrovirus. Il code pour une polyprotéine qui sera découpée en protéines de capsid, de nucléocapsid et de matrice par la protéase virale;
- le gène *pol* code pour les trois protéines enzymatiques : TI, endonucléase/intégrase p34 et la protéase p10. Ces protéines sont nécessaires au cours des différentes étapes du cycle viral;
- le gène *env* code pour la gp 160 qui est le précurseur de deux protéines différentes : la protéine de surface (gp 120) et la protéine trans-membranaire (gp41). Ces protéines, présentes à la surface de la membrane des virions, sont les premiers déterminants du type de

cellules pouvant être infectées puisqu'elles reconnaissent des récepteurs cellulaires de surface.

Les gènes supplémentaires du VIH-1 :

- le gène *tat* (trans- activateur) augmente l'expression des gènes. La protéine *tat* est un amplificateur extraordinaire de réplication ;
- le gène *rev* (regulator of virion protein) exerce une fonction de régulation différentielle ;
- le gène *nef* (negative regulatory factor ou facteur de régulation négative) a un rôle de régulation négative. La protéine *nef* se trouve non pas dans le noyau mais dans le cytoplasme ;
- le gène *vif* (virion infectivity factor ou facteur déterminant le pouvoir infectant du virus) intervient dans la réplication virale, la protéine *vif* augmente « l'infectivité » du virus. Les virus sans gène *vif* sont perturbés au niveau des dernières étapes de l'infection et infectent moins les cellules ;
- le gène *vpr* (viral protein r) code pour une protéine incorporée dans le virion. Cette protéine agit avec la protéine p6 du gag et est localisée au niveau du noyau. Les fonctions de la protéine *vpr* sont d'orienter les complexes de pré-activation de certains gènes cellulaires. Son action se traduit par une accélération du taux de réplication ;
- le gène *vpu* (viral protein u) retrouvé uniquement chez les VIH-1 et certains VIS. La protéine *vpu* est une protéine de membrane à deux fonctions : dégradation des CD4 dans le réticulum endoplasmique et augmentation du nombre de virions libérés des cellules infectées (réplication, assemblage, maturation des virions).

1-4-3 CELLULES CIBLES ET RESERVOIRS CELLULAIRES

Au cours de l'infection, le VIH va se lier à son récepteur, la molécule CD4, par l'intermédiaire de la protéine gp120 présente à la surface de son enveloppe. La molécule CD4 est une glycoprotéine exprimée à la surface de certaines sous-populations lymphocytaires, principalement les lymphocytes T CD4 et les monocytes/macrophages, cibles de l'infection par le VIH (**14**). Ces cellules

présentatrices d'antigènes jouent probablement un rôle important de réservoir, de dissémination et d'entrée du virus dans l'organisme.

Dans les organes lymphoïdes, le VIH est capté par les cellules folliculaires dendritiques qui vont pouvoir garder des virions infectieux longtemps à leur surface et permettre l'infection de lymphocytes lors de contacts cellulaires. Chez la souris, il a été montré que les virions captés sur des cellules folliculaires dendritiques pouvaient rester infectieux pendant neuf mois (15).

Le VIH infecte également des lymphocytes TCD4+ quiescents qui ne produiront du virus qu'une fois activés. Ces cellules, ainsi que d'autres cellules infectées comme les cellules du système nerveux central constituent pour le virus un réservoir difficile d'accès pour le système immunitaire (16).

1-4-4 LA REPLICATION VIRALE (10)

Les principales étapes du cycle réplicatif du VIH sont communes à tous les rétrovirus. Leur connaissance est essentielle à la compréhension de la physiopathologie de l'infection VIH.

1-4-4-1 La fixation et l'ancrage des virus sur les récepteurs cellulaires : ils constituent la première étape du cycle viral. Les structures de surfaces du VIH jouent un rôle primordial et les deux gp de l'enveloppe sont directement impliquées dans le mécanisme de fixation et de fusion. Le récepteur du virus à la surface cellulaire est la glycoprotéine CD4 auquel se lie la gp120. Il faut aussi noter qu'une deuxième molécule intervient dans la réception, le corepteur CXCR4 ou le CCR5. L'attachement des particules virales sur la cellule cible est dû à une interaction très forte entre la gp120 et le récepteur cellulaire qui est l'extrémité de la molécule CD4. La gp transmembranaire joue un rôle de perforation de la cellule réceptrice après l'étape de reconnaissance gp120-CD4 participant ainsi à la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire.

1-4-4-2 L'internalisation : Après la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire de la cellule cible, la nucléocapside (contenant le génome viral et les enzymes) est introduite dans le cytoplasme.

1-4-4-3 La rétrotranscription : après décapsidation l'ARN du virus est libéré dans le cytoplasme. Le brin d'ARN est copié en ADN intermédiaire simple brin grâce à la TI. On obtient un hybride ARN – ADN. Une ribonucléase intervient

alors pour détruire l'ARN d'origine et la polymérase produit alors un second brin d'ADN en utilisant le premier comme matrice.

1-4-4-4 L'intégration : l'ADN double brin migre vers le noyau et une troisième enzyme, l'intégrase ou l'endonucléase, intervient. Elle permet l'intégration de la copie d'ADN du génome viral dans le génome cellulaire sous forme de provirus, l'information virale se répliquant chaque fois que la cellule se divise.

1-4-4-5 La transcription du provirus : le provirus est transcrit en ARN génomique par l'ARN polymérase de l'hôte; Le taux de cette synthèse est contrôlé par les protéines de régulation codées par les gènes *tat* et *rev*. Cet ARN messenger migre alors du noyau vers le cytoplasme et est épissé en différents ARN messagers codant pour les protéines Env et pour les protéines de régulation Tat, Rev et Nef.

1-4-4-6 L'assemblage des polyprotéines virales et l'encapsulation : cette dernière étape conduit à la maturation des protéines virales après clivage par la protéase virale et à la formation de virions qui bourgeonnent à la surface de la cellule avant d'être libérés dans le milieu extracellulaire. Ces particules vont alors infecter à leur tour d'autres cellules cibles dans l'organisme, accélérant ainsi la dissémination virale.

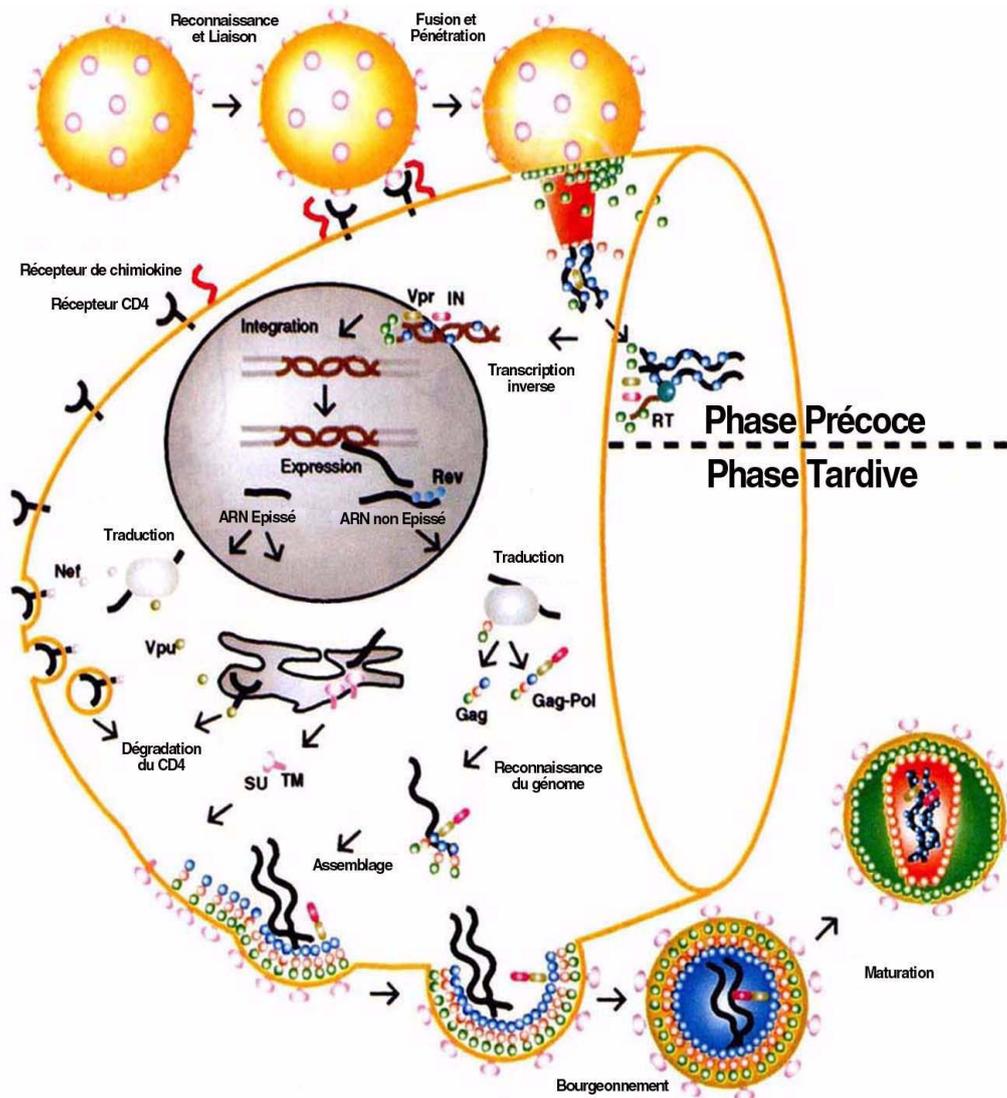


Figure 3 : cycle de réplication du VIH-1 (17)

1-4-5 LA VARIABILITE GENETIQUE (18)

La variabilité des VIH est une des caractéristiques majeures de ces virus. Elle est liée aux erreurs d'incorporation de nucléotides qu'effectue la TI, lors de la rétrotranscription. Ce taux d'erreur est de 1 à 10 mutations par génome et par cycle. Par ailleurs la dynamique de la réplication virale est très élevée, avec une production de l'ordre de 1 à 10 milliards de virus par jour. La variabilité n'est pas la même sur tout le génome viral. Parmi les gènes codant pour les protéines de structure, le gène *env* est le plus variable et le gène *pol* le plus conservé. C'est l'analyse des gènes *env* et *gag* qui est la plus utilisée pour étudier la diversité génétique. La variabilité reflète d'une manière générale l'adaptation du virus à son environnement, ce qui lui permet de résister aux

antirétroviraux, d'étendre son tropisme ou d'échapper aux réponses immunes de l'organisme. Actuellement, les deux types viraux majeurs, représentés par le VIH-1 et le VIH-2, résulteraient de deux transmissions zoonotiques différentes à partir du chimpanzé (*Pan troglodytes* SIVcpz) pour le premier et de sootey mangabey (*SIVmac*) pour le second. Les études phylogénétiques laissent supposer que ces virus ont un ancêtre commun. Le VIH-2 fait l'objet de très peu d'études. Sa diffusion est beaucoup plus limitée que le VIH-1. Il est essentiellement présent en Afrique de l'ouest.

La variabilité génétique des VIH est un des nombreux obstacles auxquels les scientifiques sont confrontés. Ses conséquences sur les tests de diagnostic, les traitements antirétroviraux, la transmissibilité, la pathogenèse et la vaccination sont les plus mentionnés.

1-4-6 CLASSIFICATION DU VIH-1

Depuis 1998, les VIH-1 sont classés en trois groupes M, N et O (**18, 19**) :

1-4-6-1 le groupe Majeur (M) : la grande majorité des souches responsables de la pandémie appartiennent à ce groupe dans lequel l'analyse phylogénétique a permis d'identifier plusieurs sous-types. Parmi ces derniers, on distingue des sous-types dits purs et des virus recombinants qui sont des mosaïques de différents sous-types. La différence des séquences nucléotidiques du gène *env* entre les sous-types est au moins de 20% (20 à 30% en général). Il y aurait ainsi seulement 9 sous-types au sein du groupe M (A, B, C, D, F, G, H, J, K). Certains virus mosaïques sont uniques ou limités à des petits groupes de transmission, d'autres jouent un rôle majeur dans l'épidémie globale du SIDA, d'où leur appellation : « circulating recombinants forms » ou CRFs. Ces formes recombinantes sont des formes hybrides qui résultent de l'évolution du virus par des phénomènes de recombinaison entre différents sous-types viraux lors de la co-infection chez le même individu. Ainsi, dans la classification actuelle on considère que les sous-types E (A/E) et I (A/G/I) sont des virus recombinants.

En Afrique de l'ouest le sous-type A est le plus prédominant mais tous les autres sous-types sont aussi présents.

Au Mali, les sous-types A et G sont les plus fréquemment rencontrés chez les professionnels de sexe (20). On retrouve également un CRF nommé CRF06-cpx précédemment appelé 95ML849 (21), qui implique quatre différents sous-types A, G, K et J (22). Bien que sa prévalence exacte n'est pas connue, CRF06-cpx circule aussi au Sénégal, Burkina Faso, Nigeria.



Figure 4 : Répartition géographique des sous-types de VIH-1 du groupe M (23)

1-4-6-2 le groupe non-M et non-O (N) : les VIH-1 du groupe N sont représentés par 2 isolats, provenant de patients camerounais. Ces isolats ont la particularité d'être proches d'un virus isolé chez le chimpanzé au Gabon (SIVcpz-gab) si on analyse leur gène env. Phylogénétiquement, les autres parties du génome sont équidistantes des VIH-1 groupe M et du SIVcpz-gab.

1-4-6-3 le groupe Outlier (O) : le VIH du groupe O fut d'abord décrit en 1990 chez un individu d'origine camerounaise. A cette souche (ANT70) vinrent s'ajouter deux autres isolats en 1994. Ils regroupent un nombre limité de

variants très éloignés de M qui présenteraient près de 50% de divergence avec les autres VIH-1.

1-5 PHYSIOPATHOLOGIE

L'infection par le VIH se caractérise par une réplication continue, en particulier dans les tissus lymphoïdes, d'un virus hautement variable, capable de s'adapter aux conditions extérieures. Le mécanisme de destruction des lymphocytes CD4+ n'est pas connu et son origine multifactorielle s'expliquerait par :

- la lyse directe des cellules infectées par un effet cytopathologie ;
- la lyse par les lymphocytes CD8+ cytotoxiques de lymphocytes CD4+ non infectés mais porteurs passifs à leur surface de la gp cytopathologie virale ;
- les phénomènes d'apoptose (mort cellulaire programmée) lors de la stimulation antigénique de cellule ayant été préalablement en contact avec des antigènes VIH ;
- l'hyperstimulation cellulaire aboutissant à l'anergie des cellules.

1-5-1 HISTOIRE NATURELLE DE L'INFECTION

Après contamination par le VIH et dissémination du virus dans l'organisme, l'évolution d'une infection non traitée va se décomposer en 3 phases (**10, 24**) :

1-5-1-1 La primo-infection (syndrome grippal aigu, phase séroconversion)

Cette première phase va durer de 3 à 8 semaines en fonction des individus. On observe dans 50 à 70% des cas un syndrome pseudo grippal avec fièvre, malaise, céphalées, diarrhées, lymphadénopathies, arthralgies, éruptions cutanées et parfois signes méningés. Ce syndrome dure 1 à 2 semaines et régresse spontanément à mesure que la réponse au VIH se développe. Lors de cette phase, le VIH se réplique fortement puis la virémie baisse parallèlement à l'augmentation du nombre de lymphocytes T CD8+ et d'anticorps anti-VIH dans le sang. L'apparition de ces anticorps anti-VIH environ 3 semaines après la contamination permet le dépistage de l'infection

(séroconversion). Actuellement, d'autres méthodes plus fines permettent un diagnostic plus précoce, comme le dosage de l'antigène p24 produit par le virus.

1-5-1-2 La phase asymptomatique

A ce stade la sérologie est positive. Elle est aussi appelée phase de latence clinique, dont la durée moyenne est de 10 ans chez l'adulte, dans les pays développés et en absence de traitement. Elle représente l'intervalle entre la primo-infection et l'apparition de symptômes. Pendant cette période, le traitement diminue la charge virale, augmente le nombre des lymphocytes CD4 et retarde ou empêche la phase symptomatique. Pendant cette phase, le virus est en lutte permanente avec les cellules du système immunitaire.

1-5-1-3 Le stade SIDA (phase symptomatique)

Dans les 10 ans qui suivent l'infection par le VIH, environ 50% des sujets développe un SIDA déclaré, environ 40% sont atteints d'affection souvent associées au SIDA et 5 à 10% demeurent asymptomatiques. A cette phase tardive de l'infection, on observe une augmentation de la charge virale suivie par la chute du nombre de lymphocytes CD4+ ($< 200/\text{mm}^3$). Elle se définit par une lymphopénie généralisée et persistante accompagnée de manifestation symptomatiques (diarrhée chronique, amaigrissement, fièvre...). Apparaissent alors des infections multiples dites opportunistes, des cancers et des encéphalites.

La progression de l'infection à VIH est plus rapide chez certains individus infectés. La vitesse de l'évolution dépend des caractéristiques du virus et de l'hôte. En ce qui concerne le virus, il s'agit du sérotype et de la souche : le VIH-1 et certaines souches de VIH-1 entraînent une évolution plus rapide. Pour l'hôte, les facteurs d'une évolution plus rapide seraient (6) :

- l'âge (moins de 5 ans ou plus de 40 ans) ;
- les infections concomitantes : herpès, tuberculose, MST ;
- groupe tissulaire HLA ;
- le polymorphisme génétique des co-récepteurs viraux.

1-5-2 CLASSIFICATION

La première définition de l'infection à VIH/SIDA a été établie en 1982 par le CDC (25). En 1983 une deuxième définition fut élaborée après la mise en évidence du VIH et le développement d'une sérologie fiable.

Les deux premières définitions impliquant l'usage de moyen dont ne disposent pas les PVD et plus précisément les pays africains, une définition fut élaborée à leur intention en 1986 : c'est la définition de Bangui (26).

En 1988, la nécessité de n'avoir qu'une définition emmena les CDC et l'OMS à établir une troisième définition (27).

C'est ainsi que pour le suivi épidémiologique, différentes classifications ont été proposées, répartissant les patients en quatre groupes homogènes en rapport avec les manifestations cliniques :

- la classification du WRAIR (28);
- La classification du CDC de 1986 répartissant les patients en quatre groupes s'excluant mutuellement (29) (tableau I), sa révision en 1993 distingue trois catégories cliniques (11) (tableau II) ;
- la classification OMS de 1990 qui classe les patients en quatre stades cliniques.

Tableau I : Classification des manifestation de l'infection à VIH/SIDA CDC 1986 (29).

Classification CDC 1986

CDC I : Infection aiguë

CDC II : Infection asymptomatique

CDC III : Lymphadénopathie généralisée persistante

CDC IV : Autres pathologies

CDC IV A : Signes généraux

CDC IV B ou E : Pathologies opportunistes

Tableau II : Classification des différents stades de l'infection VIH (11)

Classification de l'infection VIH en tenant compte du nombre de LT CD4+			
	>500/mm ³	200-499/mm ³	< 200/mm ³
A : asymptomatique primo-infection, lymphadénopathie	A1	A2	A3
B : symptomatique, sans critères A ou C	B1	B2	B3
C : SIDA	C1	C2	C3

1-5-3 REPONSES IMMUNITAIRES AU VIH

Le VIH induit de puissantes réponses immunes spécifiques permettant un contrôle au moins partiel de l'infection lors de la primo-infection et au stade asymptomatique. L'extrême variabilité du virus impose une adaptation constante des réponses immunes à l'émergence permanente de variants viraux chez un même individu, induisant un épuisement progressif du système immunitaire. On peut tout aussi observer rapidement l'apparition d'une immunité à médiation cellulaire en particulier manifestée par la génération de lymphocytes T cytotoxiques dirigés contre les différentes protéines virales. La réponse cellulaire spécifique semble déclinée au cours de la progression du déficit immunitaire.

Au cours de l'infection par le VIH, le nombre de LT CD4+ circulant diminue progressivement. Les causes principales de cette disparition seraient la destruction des cellules T CD4+ infectées par le virus, la séquestration des LT CD4+ dans les organes lymphoïdes, la mort des LT CD4+ par activation cellulaire, et la perturbation du renouvellement des cellules T (30).

Par ailleurs, il semblerait qu'au cours de l'évolution de la maladie, un changement de profil dans la sécrétion des cytokines ait lieu. Il a été décrit qu'une évolution d'un profil de type T helper1 (Th1) vers un profil de type Th2

serait impliquée dans la progression vers un stade SIDA (31). Cette évolution ne serait pas due à un changement des Th1 en Th2 mais plutôt à la perte de fonction des cellules mémoires de type Th1 (32).

Aussi des études faites chez des sujets séropositifs ont mis en évidence des fortes réponses TCD4+ obtenues après une thérapie antirétrovirale. Ces mêmes études ont montré l'importance de générer des réponses cellulaires TCD4+ en vue du développement d'un vaccin efficace contre le VIH, d'autant plus que la réponse cellulaire TCD4+ est nécessaire au maintien d'une réponse immunitaire efficace contre les infections virales chroniques (33).

En ce qui concerne les LT CD8+, ils persistent à des fréquences importantes pendant la phase asymptomatique ou la phase chronique de l'infection en l'absence de traitement (33). Les réponses LT CD8+ reste apparemment stables jusqu'au stade SIDA, mais en réalité les LTCD8+ deviennent de moins en moins efficaces. Un déclin est ensuite observé durant la phase SIDA (34). Différentes explications ont été proposées pour expliquer l'échec du contrôle de la réplication virale et le déclin de la fonctionnalité des LT CD8+ engendrant à long terme le SIDA :

- les LT CD8+ spécifiques du VIH peuvent présenter des défauts de maturation, entraînant une absence de fonctions effectrices (35)
- une séquestration des LT CD8+ a lieu au niveau des organes lymphoïdes pouvant ainsi empêcher l'installation d'une réponse T CD8+ efficace vis-à-vis du virus (36)
- un faible nombre d'épitopes étaient reconnus par les LT CD8+ en primo-infection (37)
- un phénomène d'échappement viral à la réponse cellulaire par mutation est impliqué. L'échappement serait du a des mutations d'acides aminés impliqués dans la reconnaissance du TCR, dans la liaison à la molécule HLA de classe I, ou encore à des mutations qui influencent l'apprêtement de l'antigène (38)
- un phénomène d'échappement cellulaire est provoqué par la diminution de l'expression des molécules du CMH de classe I sur les cellules dendritiques et ceci est engendré par l'activité de la protéine nef du VIH (39).

Les réponses humorales spécifiques du VIH sont composées d'anticorps dirigés contre les protéines du VIH : protéines d'enveloppe (gp120, gp41), protéines de capsides (gp24, gp18), la RT, nef, etc. On distingue 3 types d'anticorps spécifiques du VIH :

- les anticorps induisant la cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC) : ils se fixent sur les cellules infectées exprimant des protéines virales, notamment la gp120 et la gp41 (40). Ces anticorps induisent la mort programmée des cellules infectées (apoptose) ;
- les anticorps neutralisants : ils se fixent sur l'enveloppe du VIH et empêchent le virus de pénétrer dans la cellule cible. Ces anticorps apparaissent chez l'homme de façon tardive (plusieurs mois après l'infection) et généralement en faible quantité (41). Les nombreuses glycosylations présentes sur les protéines de l'enveloppe empêchent l'accès des anticorps neutralisants à des sites structuraux importants de la gp120, lesquels ne seront exposés que lors de la fixation du virus sur sa cellule cible (42). L'étude systématique de l'activité neutralisante des anticorps dirigés contre l'enveloppe du VIH a permis de montrer qu'ils sont en grande majorité dirigés contre une petite région hypervariable, appelée la boucle V3. Cependant quelques mois plus tard, bien que ces anticorps soient toujours présents, le virus que l'ont peut isoler du patient n'est plus sensible à leur action neutralisante. L'analyse de la séquence de ce nouveau virus montre que les variations responsables de cette résistance aux anticorps neutralisants initialement synthétisés affectent la boucle V3. Pendant cette évolution, un autre type d'anticorps neutralisant apparaît mais de façon retardée et à des taux beaucoup plus faibles. Ces anticorps neutralisants reconnaissent des épitopes conformationnels de l'enveloppe du VIH qui sont ceux impliqués dans la reconnaissance du récepteur CD4. Tout se passe donc comme si le virus orientait la réponse immunitaire contre une région de son enveloppe qu'il est capable de muter sans perdre ses propriétés infectieuses ;
- les anticorps facilitants : ils favorisent l'entrée du virus dans la cellule cible soit par la mise en place de la voie alterne du complément, soit par l'expression du récepteur au fragment Fc des immunoglobulines (Ig) sur

les cellules comme les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques...etc. Ce type d'anticorps a été trouvé chez les volontaires sains immunisés avec la gp160 recombinante du VIH-1 (43).

Il existe également des anticorps spécifiques de protéines du VIH autres que ceux de l'enveloppe. On distingue des anticorps dirigés contre la protéine Tat du VIH. Une corrélation a d'ailleurs été établie entre la présence de ces anticorps anti-Tat et la non progression vers le stade SIDA (44).

1-6 EPIDEMIOLOGIE

En dépit des progrès réalisés, l'épidémie de SIDA continue de devancer les efforts mondiaux. Le nombre d'infections et de décès est en augmentation d'après le dernier rapport de l'ONUSIDA. Environ 5 millions de personnes ont été infectées au cours de l'année 2005. A l'échelle mondiale, le nombre de personnes vivant avec le VIH continue d'augmenter de 35 millions en 2001 à 40,3 millions en fin 2005 (2). Malgré un accès récemment amélioré aux traitements antirétroviraux et à la prise en charge dans de nombreuses régions du monde, 3,1 millions de personnes sont mortes de maladies liées au SIDA y compris 570000 enfants de moins de 15 ans. Le Nigéria (3,2 à 3,6 millions), L'Afrique du Sud (environ 5 millions) et l'Inde (5,1 millions) sont les pays où l'on dénombre le plus de séropositifs. Le VIH, agent étiologique du SIDA est devenu depuis 2001 la première cause de mortalité en Afrique subsaharienne et la quatrième à travers le monde. La portée et l'impact de l'épidémie ne sont pas les mêmes dans toutes les régions; certains pays sont plus touchés que d'autres et dans un même pays il y a généralement d'importants écarts du niveau d'infection entre les provinces, les Etats ou les districts (2).

Dans les pays industrialisés d'Amérique du nord, d'Europe occidentale et centrale, on estime à 1,9 millions le nombre de personnes vivant avec le VIH (2). Dans ces pays l'introduction de traitement antirétroviral à grande échelle a permis de diminuer la mortalité associée au SIDA.

Au cours des deux dernières années, le nombre d'infection à VIH en Asie a grimpé de près de 50%, une hausse largement attribuable aux épidémies croissantes en Chine, en Indonésie et au Vietnam. On estime que 8,3 millions

de personnes vivaient avec le VIH dans la région y compris 1,1 millions de personnes ayant contracté une infection au cours de l'année écoulée.

L'Amérique latine compte environ 1,8 millions de personnes infectées. En 2005 ce sont approximativement 66000 personnes qui sont mortes de SIDA et 200000 ont été nouvellement infectées.

Les Caraïbes restent la sous région où l'on observe la prévalence la plus élevée hors d'Afrique (au moins 3%). Le pays le plus affecté est Haïti où la prévalence nationale approche les 5,6% en 2004(3). En 2005 l'épidémie du SIDA a entraîné 24000 décès aux caraïbes, ce qui en fait la principale cause de mortalité parmi les adultes de 15 à 44 ans.

En Europe orientale et Asie centrale, le nombre de personnes vivant avec le VIH est estimé à 1,6 millions de personnes par rapport à 160000 environ en 1995. Quelque 75 % des infections signalées entre 2000 et 2004 intéressent des jeunes de moins de 30 ans. L'Estonie, la Lettonie, la Fédération de Russie et l'Ukraine étaient les pays les plus affectés en fin 2004 (3).

Plus de 20 ans après les premiers cas de SIDA décrits, la situation est dramatique dans les pays en voie de développement, et tout particulièrement en Afrique subsaharienne. Cette région demeure, et de loin la plus durement touchée par l'épidémie du VIH / SIDA. Elle abrite 25,8 millions le nombre de personnes vivant avec le VIH (2), ce qui représente les 2/3 de porteurs de virus dans le monde. En 2005 on estime à 3,2 millions le nombre de nouvelles infections alors que 2,4 millions d'adultes et d'enfants sont morts du SIDA. Il existe toujours en Afrique subsaharienne des variations importantes de prévalence du VIH.

L'Afrique australe est la partie du continent la plus touchée avec 11,4 millions de personnes vivant avec le VIH, soit 30% du total dans le monde pour une population qui ne représente que 2% de la population mondiale. une prévalence très élevée dans les centres de soins prénatals (femmes enceintes de 15 à 44 ans) est toujours enregistrée dans quatre pays de la région : Botswana, Lesotho, Namibie et Swaziland.

En Afrique centrale, la situation est difficile à évaluer en raison des activités de surveillance limitées. C'est en République Centrafricaine et au Cameroun que

le taux de prévalence semble élevé chez la femme enceinte (proche de 14%) (3).

En Afrique orientale, région touchée en premier par l'épidémie, il y a une baisse réelle des taux d'infection. La baisse de la prévalence semble se produire au Kenya, en Ouganda et au Zimbabwe. Pourtant, chacun de ces pays reste frappé par une épidémie massive et désastreuse (2). Cette baisse de la prévalence est également notée au Rwanda et au Burundi en 2004 (3).

En Afrique de l'Ouest, la situation semble stable, mais on note des différences importantes quant à l'étendue de l'épidémie. La prévalence chez la femme enceinte est en moyenne de 3 à 4%. Elle est élevée en Côte d'Ivoire et au Nigeria qui est le troisième pays du monde où vit le plus grand nombre de personnes vivant avec le VIH. A l'opposé, la prévalence est de l'ordre de 1% en Gambie, en Mauritanie, au Niger, au Sénégal.

Au Mali, le taux de prévalence en 2001 était de 1,7% dont 2% chez les femmes et 1,3% chez les hommes. La tranche d'âge la plus touchée est de 25-39 ans (2,11 à 3,3%) (4). En 2000, une étude comportementale et de séroprévalence du VIH et des IST (Infections Sexuellement Transmissibles) au sein de cinq groupes à haut et moyen risque a révélé des taux de prévalences suivantes : 29,7% chez les prostituées, 6,7% chez les vendeuses ambulantes, 4,1% chez les camionneurs et 1,7% chez les aides ménagères (4). En cas de non maîtrise de l'épidémie, le taux de prévalence pourrait atteindre 6% chez les adultes en 2010 (45).

1-7 LE SYSTEME HLA

On appelle système HLA (Human Leucocyte Antigens) le complexe majeur d'histocompatibilité de l'Homme (CMH). Découverts par le Professeur Jean DAUSSET en 1958, les antigènes du système HLA ont été initialement mis en évidence sur les globules blancs et ont été reconnus pour leur aptitude à intervenir dans le rejet de greffes allogéniques

(46). Par la suite la répartition cellulaire des antigènes du système HLA a été précisée et élargie. La désignation de ce système par le terme de CMH n'indique que l'une de ses propriétés qui est la capacité d'induire une forte réponse immunitaire allogénique lors de greffe ou de transplantation. Il est défini comme l'ensemble des molécules impliquées dans la présentation de peptides au récepteur des cellules T(46). Le CMH est qualifié de complexe car il renferme des gènes sans relation avec la fonction de présentation, comme les gènes codant pour le TNF (Tumor Necrosis Factor).

Ces gènes s'expriment sous la forme d'antigène à la surface de la plupart des cellules de l'organisme et permettent à chaque individu de reconnaître ses propres cellules ou en d'autres termes, de différencier le « soi » du « non soi ». Sa principale fonction biologique est de fixer les peptides antigéniques et de les présenter à la surface cellulaire aux lymphocytes T. Le système HLA intervient dans des domaines aussi variés que :

- la réaction immunitaire contre les infections ;
- la réaction immunitaire anti-tumorale ;
- la susceptibilité et la résistance aux infections et aux maladies auto-immunes ;
- les rejets de greffe.

1-7-1 STRUCTURE DES MOLECULES HLA

Les molécules HLA sont organisées en domaines. Ce sont les domaines les plus éloignés de la membrane cellulaire qui portent le polymorphisme.

1-7-1-1 Structure des molécules de classe I (47)

Les molécules de classe I sont des glycoprotéines hétérodimériques exprimées à la surface des cellules nucléées. Elles sont formées de l'association covalente d'une chaîne lourde α , transmembranaire et d'une chaîne légère β_2 microglobuline.

La chaîne lourde est porteuse de la variabilité allélique, organisée en trois domaines extracellulaires α_1 , α_2 et α_3 . Les domaines α_1 et α_2 portent le polymorphisme, tandis que le domaine α_3 est conservé. Il s'en suit une partie transmembranaire hydrophobe et une courte queue intracytoplasmique.

La chaîne légère invariante la $\beta 2$ microglobuline ($\beta 2m$) est une protéine soluble non membranaire codée par un gène localisé sur le chromosome 15. Elle est associée de façon non covalente à la chaîne lourde au niveau du domaine $\alpha 3$ et l'association s'effectue très précocement dans le réticulum endoplasmique. C'est un composant essentiel de la molécule nécessaire à sa stabilité et à son expression à la surface cellulaire.

Aussi la structure de la molécule de classe I fait apparaître une cavité entre les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ appelée sillon où peut se glisser un peptide de 8 à 10 acides aminés. Le domaine $\alpha 3$ porte un site d'interaction avec la molécule CD8.

1-7-1-2 Structure des molécules de classe II (47)

Les molécules de classe II sont des glycoprotéines transmembranaires constituées d'une chaîne α et d'une chaîne β s'associant de façon non covalente. Chacune des chaînes est ancrée à la membrane cellulaire et possède une partie extracellulaire faite de deux domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ pour la chaîne α et $\beta 1$ et $\beta 2$ pour la chaîne β suivis des parties transmembranaire et intracytoplasmique très courtes. Les domaines les plus externes sont les plus polymorphes. Ils s'associent très étroitement pour former une cavité qui reste ouverte aux deux extrémités appelée sillon où pourra donc se loger un peptide de longueur plus variable que pour les molécules de classe I. La partie externe du domaine $\beta 2$ porte un site d'interaction avec la molécule CD4.

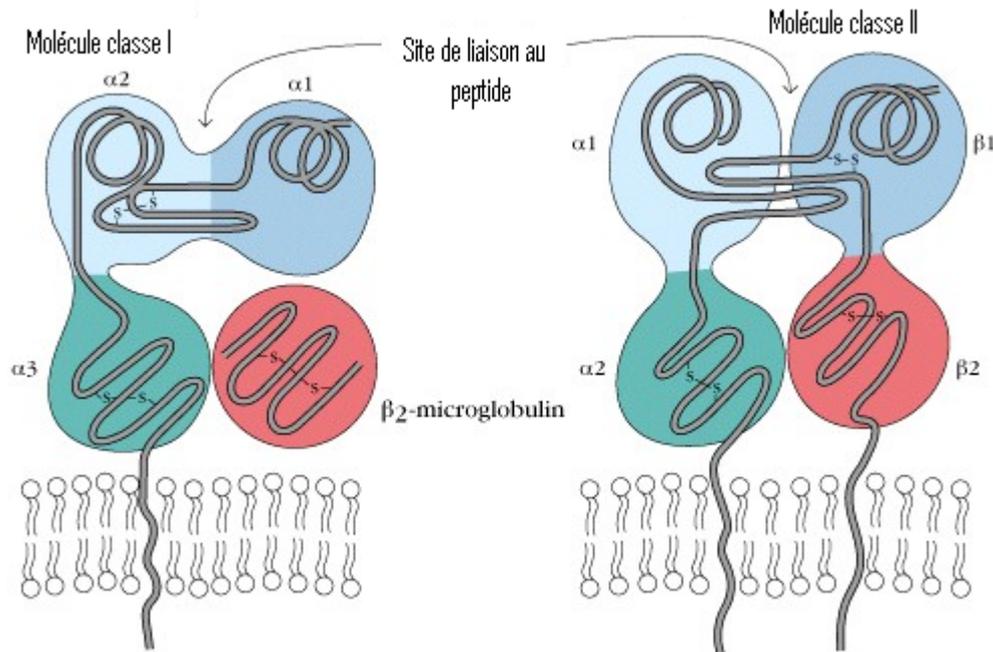


Figure 5 : Structure des molécules du CMH classe I et II (48)

1-7-2 DISTRIBUTION TISSULAIRE DES MOLECULES HLA (49)

La distribution tissulaire des molécules HLA de classe I (conventionnelles A, B, C) est très ubiquitaire. Dans le sang, à l'exception des globules rouges, toutes les cellules en possèdent à leur surface. La plupart des organes et tissus les expriment avec quelques exceptions : cellules et vaisseaux du système nerveux central, hépatocytes, pancréas exocrine.

L'expression constitutive tissulaire des molécules de classe II est beaucoup plus restreinte que celle de classe I. Dans le sang, seules les cellules dendritiques, les lymphocytes B et les monocytes en possèdent en surface. Dans les tissus, outre les macrophages et les cellules dendritiques, les molécules de classe II existent sur les endothéliums capillaires et certaines cellules de l'épithélium de l'intestin grêle. Néanmoins, sous l'effet de cytokines comme l'interféron δ ou le TNF (Tumor Necrosis Factor), de nombreuses cellules parenchymateuses et les lymphocytes T peuvent synthétiser et exprimer des molécules HLA de classe II.

Tableau III : Distribution tissulaire des molécules HLA

Tissus	HLA Classe I	HLA Classe II
Lymphocytes T	+++	+/-
Lymphocytes T activés	+++	++
Lymphocytes B	+++	+++
Macrophages	+++	++
Autres CPA	+++	+++
Epithélium thymique	+	+++
Neutrophiles	+++	-
Hépatocytes	+	-
Rein	+	-
SNC	+	-
Erythrocytes	-	-

1-7-3 ORGANISATION GENOMIQUE (46, 49)

Le système HLA est constitué par un ensemble de gènes localisés sur un segment du bras court du chromosome 6. IL comporte 3 régions majeures codant pour les protéines impliquées dans le déclenchement et la régulation de la réponse immunitaire. Chacune de ces régions comprend de nombreux gènes repartis en locus. A partir du centromère est successivement rencontré:

- la région de classe II avec trois loci DP, DQ et DR. Cette région code également pour les molécules impliquées dans le traitement et le transport des peptides chargeant les molécules HLA (TAP et LMP).
- la région de classe III, intermédiaire comporte en réalité des gènes sans relation évidente avec le système HLA. Cependant elle compte de nombreux gènes impliqués dans la réponse immunitaire comme les gènes du complément, certains gènes des cytokines comme le TNF.
- la région de classe I A, B, C, E, F, G ; les trois derniers étant dits gènes HLA classe I non conventionnels ou classe I b ;

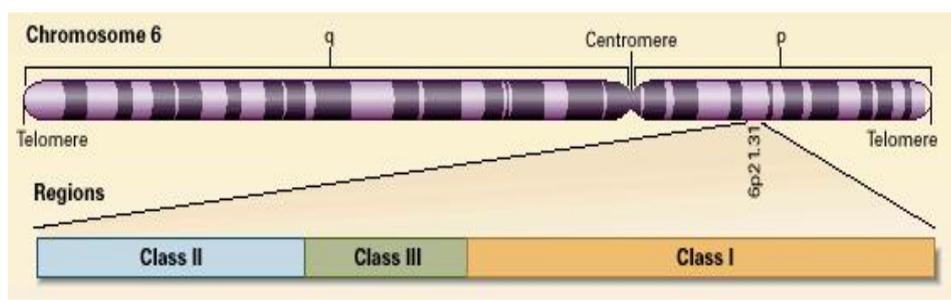


Figure 6 : Représentation des gènes HLA sur le chromosome 6.

1-7-4 LES CARACTERES PRINCIPAUX DU SYSTEME HLA (46, 50)

Tous les gènes du HLA sont caractérisés par trois propriétés majeures ;

- le polymorphisme : il existe un grand nombre d'allèles (formes particulières que prend un gène) pour chacun des loci. Le polymorphisme, mis en évidence grâce à des données sérologiques et cellulaires est désormais établi par l'étude de la variabilité de la séquence en acides aminés des domaines des molécules HLA qui permet de caractériser les nouveaux allèles et les régions les plus polymorphes de classe I et II. Certains allèles d'un locus sont associés préférentiellement avec des allèles spécifiques d'un autre locus: liaisons entre les allèles de classe I (A1 B8), entre des allèles de la région de classe II (DQA et DQB) ou entre classe I et classe II (B8-DR3). Ce phénomène appelé « déséquilibre de liaison » reste inexplicé et varie ainsi que la fréquence des différents allèles selon et dans les différentes ethnies.
- la codominance : chaque allèle, sur chaque chromosome, a une expression et ce produit peut être détecté par une technique adéquate.
- la liaison étroite : tous les gènes sont transmis en bloc de parents à enfants. L'ensemble de ces gènes portés par un chromosome 6, constitue l'haplotype.

1-7-5 DEGRADATION ET PRESENTATION DE L'ANTIGENE

Le rôle fondamental des molécules du CMH est de signaler aux lymphocytes T, la présence de structures étrangères ayant réussi à pénétrer à l'intérieur de nos cellules. Pour cela, elles prennent en charge des peptides provenant de la

dégradation de protéines issues des micro-organismes ou des tissus du soi et les acheminent à la surface des cellules pour y accomplir leur fonction de signalisation à l'égard des lymphocytes T. A l'état normal, les molécules ne contiennent que des peptides du soi vis-à-vis desquels le système immunitaire est tolérant ou indifférent. En cas d'infection, virale par exemple, générant des protéines étrangères intracytoplasmiques, les peptides qui en découlent entreront en compétition avec les peptides du soi, occupant le site de présentation épitopique. Les protéines étrangères qui vont être dégradées en peptides retrouvés sur les molécules du CMH, proviennent soit de la synthèse endogène de la cellule qui effectue la présentation, soit de la capture de matériel exogène par cette même cellule. Ainsi les molécules de classe I et II suivent deux voies de synthèse totalement indépendantes, ce qui explique leur capacité à présenter un peptide respectivement d'origine endogène et exogène.

1-7-5-1 La voie endogène de dégradation

Cette voie permet la présentation à la membrane cellulaire de peptides intracytoplasmiques par les molécules de classe I. Ces molécules sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique, traversent ensuite l'appareil de golgi puis sont dirigées vers la membrane plasmique.

Les peptides présentés proviennent de la dégradation dans le cytoplasme de protéines intracytoplasmiques (cellulaires ou virales). Cette dégradation est effectuée dans des complexes cytosoliques, les protéasomes, qui vont les couper en petits fragments de 8 à 10 a.a. Ces derniers sont ensuite transportés dans le réticulum endoplasmique (RE) par un mécanisme de transport actif utilisant les protéines TAP (transporter associated with antigen processing) dont les deux chaînes (TAP 1 et TAP 2) sont codées par le locus CMH II. Ce transporteur est localisé sur la membrane du réticulum endoplasmique (RE). Dans le RE, les peptides rencontrent des molécules de classe I. La chaîne lourde, la $\beta 2m$ et le peptide s'associent en un complexe trimérique où chaque partenaire est indispensable. En effet, le peptide stabilise en conformation correcte les complexes chaîne lourde- $\beta 2m$. De la même façon, en l'absence de $\beta 2m$, le peptide se lie faiblement à la chaîne lourde. Le complexe trimérique

formé et stable sera alors transporté jusqu'à la surface cellulaire via l'appareil de Golgi et être ainsi exposé à la reconnaissance des lymphocytes cytotoxiques CD8+ (47).

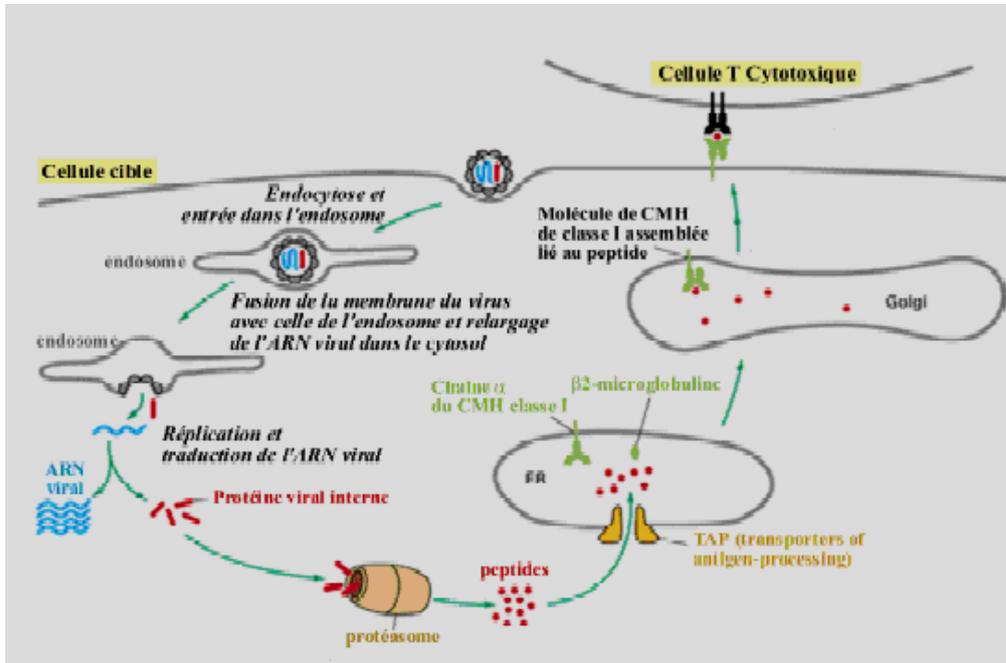


Figure 7 : Dégradation et transport de l'antigène qui fixe les molécules de classe I (51)

1-7-5-2 La voie exogène de dégradation

Les molécules de classe II, présentent des peptides issus de la dégradation des protéines ayant accès à la voie d'endocytose. Pour entrer en contact avec ces peptides obtenus après digestion par des protéases, les molécules HLA doivent migrer du réticulum ou les deux chaînes de la molécule s'assemblent vers les compartiments endosomiaux. Ces molécules sont associées à une chaîne invariante Li produite aussi par le réticulum. Cette chaîne Li est une glycoprotéine membranaire qui stabilise les molécules de classe II. La chaîne invariante empêche le chargement des molécules de CMH II par les peptides endogènes présents dans le RE permettant ainsi la séparation des voies de présentation CMH I et CMH II. Cette fonction de la chaîne est due au segment CLIP (class II associated li chain peptide) de li qui occupe le sillon des molécules de classe II. Enfin la chaîne invariante favorise le transport des molécules HLA classe II vers l'appareil de Golgi puis vers les endosomes.

Les endosomes sont un compartiment cellulaire important pour le chargement des peptides sur les molécules de CMH II. En effet, c'est dans leur environnement protéolytique et acide que les antigènes internalisés par endocytose et pinocytose sont dénaturés et dégradés.

Dans les compartiments endosomiaux, la chaîne Ii est progressivement dégradée pour ne laisser qu'un peptide qui occupe le site d'ancrage peptidique de la molécule. Le complexe molécule de classe II/peptide est ensuite exporté à la surface de la cellule pour la reconnaissance par les LTCD4+ (47).

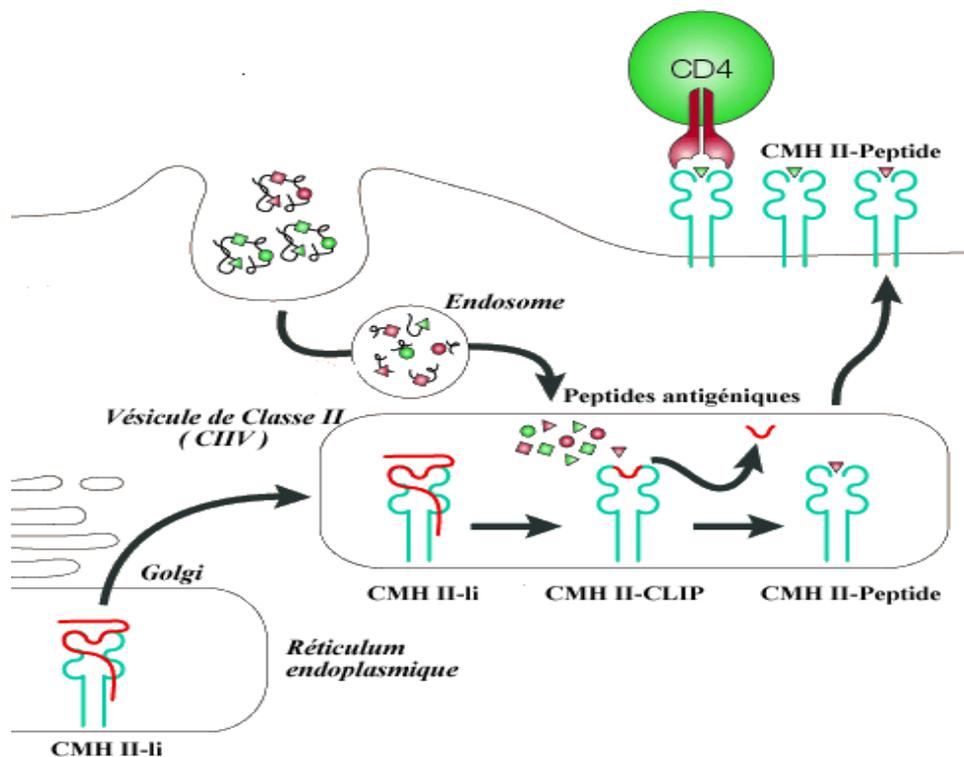


Figure 8 : Dégradation et transport de l'antigène qui fixe les molécules de classe II (52)

1-7-6 NOMENCLATURE

Une nomenclature adaptée, édictée par un comité international permet d'identifier les gènes (allèles HLA) ou les produits de ces gènes (antigènes).

La description antigénique s'exprime par une nomenclature utilisant une ou deux lettres pour identifier le locus (A, B, Cw, DR, DQ, DP) suivi d'un numéro caractérisant l'antigène considéré (A1, B7, DR8). Les antigènes du locus C sont identifiés par Cw pour éviter toute confusion avec les protéines du complément. La nomenclature génomique identifie le gène suivi d'un astérisque (A*, B*, C*, DRB1*, DQA1*) et d'un numéro de deux à cinq chiffres correspondant à la spécificité allélique (DRB1*0702). En général les deux premiers chiffres correspondent à la spécificité antigénique et les chiffres suivants correspondent au sous type allélique défini par approche génomique (53).

1-7-8 LES METHODES D'ETUDES DU SYSTEME HLA

1-7-8-1 LES TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES (46)

1-7-8-1-1 La culture mixte lymphocytaire (Mixed Lymphocyte Reaction ou MLR)

Elle a été décrite en 1964. Une culture lymphocytaire à court terme est établie à partir de cellules mononuclées du sang périphérique par exemple. Deux populations cellulaires allogéniques sont mélangées: une population répondante et une population stimulante, qui est irradiée pour l'empêcher de proliférer. Au cours de la culture, une prolifération des cellules répondantes est observée et objectivée par une transformation lymphoblastique et des mitoses.

1-7-8-1-2 L'électrophorèse bidimensionnelle

Cette technique a permis de séparer différents antigènes HLA.

1-7-8-1-3 La technique sérologique de microlymphocytotoxicité

L'étape préalable est l'isolement d'une population lymphocytaire. La séparation des cellules mononuclées du sang périphérique est réalisée sur un gradient de densité (Ficoll). Dans les différents puits d'une plaque de Terasaki, sont mis en présence des microquantités :

- des antisérums (anticorps reconnaissant chacun un antigène HLA particulier),
- une suspension de cellules mononuclées,

- du complément de lapin.

La réaction est visualisée à l'aide d'un colorant vital (l'éosine), au microscope inversé, en contraste de phase.

Si l'antisérum reconnaît l'antigène à la surface cellulaire, la membrane cellulaire est altérée et le colorant pénètre dans la cellule. La réaction est positive.

Si les cellules ne possèdent pas l'antigène correspondant à l'anticorps présent dans le puits, les cellules restent vivantes et le colorant ne pénètre pas. La réaction est négative.

1-7-8-2 LES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE (46)

La première étape en est une extraction de l'ADN cellulaire (en général l'ADN des lymphocytes du sang périphérique). Cet acide nucléique est amplifié selon les techniques désormais classiques de polymérase chain reaction (PCR) à l'aide de deux amorces, situées de part et d'autre de la région à amplifier et grâce à une enzyme, la Taq polymérase.

Les techniques d'étude du produit d'amplification peuvent être diverses :

1-7-8-2-1 PCR-SSP (Sequence Specific Primers)

Cette technique utilise l'amplification d'un groupe d'allèles avec des amorces spécifiques de régions polymorphes. La présence ou l'absence d'un allèle est déterminée en fonction de l'amplification ou de la non-amplification obtenue. Cette technique nécessite donc autant d'amplifications que d'allèles à rechercher. Les produits de la réaction sont contrôlés par migration électrophorétique en gel d'agarose avec une révélation au bromure d'éthidium en lumière ultraviolette. Cette technique est bien adaptée à l'urgence et aux petites séries.

1-7-8-2-2 PCR-SSO (Sequence Specific Oligonucleotides)

Cette technique repose sur l'amplification d'une région contenant les polymorphismes que l'on souhaite étudier. Les amorces sont situées dans des séquences consensus encadrant la région à étudier.

Les produits d'amplification sont transférés sur une membrane de nitrocellulose ou de nylon. Une hybridation par oligosonde marquée spécifique de l'allèle

recherché est réalisée. La révélation se fait actuellement par méthode immuno-enzymatique ; les nucléotides sont biotinylés et lient un conjugué à base de streptavidine marquée par une enzyme. La révélation est obtenue par addition d'un substrat chromogène hydrolysé par l'enzyme. Cette technique est adaptée aux grandes séries.

1-7-8-2-3 PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Cette technique fait intervenir des enzymes de restriction qui coupent les produits de PCR. L'ADN est coupé en un point précis selon une séquence de base spécifique de chaque enzyme. Les différents fragments obtenus sont séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide puis sont transférés sur une membrane de nitrocellulose. L'étape finale est une hybridation avec des sondes d'ADN complémentaire de la région étudiée. La révélation se fait généralement par autoradiographie. Cette technique possède de nombreux inconvénients et manque de performance.

1-7-8-2-4 Le dot-blot

Le principe de cette technique est identique à celui de la PCR-SSO, à la différence près que les sondes de révélation sont fixées sur des membranes ou des plaques. Cette technique est aussi fiable que la PCR-SSO, rapide et automatisable.

1-7-8-2-5 Séquençage

Il s'agit d'un séquençage direct par des méthodes ayant recours à des appareillages automatiques. Cette technique permet d'obtenir directement la séquence des gènes et de mettre en évidence des mutations ponctuelles au niveau des séquences nucléotidiques.

1-8 - METHODES DE DIAGNOSTIC DU VIH

Depuis 1985, le dépistage du VIH est indispensable pour garantir la sécurité des dons de sang. La recherche des anticorps anti-VIH est importante dans trois situations : le dépistage, la surveillance épidémiologique, le diagnostic de

l'infection. Les méthodes utilisées sont diverses selon l'objectif recherché et nécessitent d'être réadaptées si besoin pour couvrir les nouveaux variants du virus.

1-8-1 LES METHODES INDIRECTES

1-8-1-1 La méthode ELISA

Les méthodes immuno-enzymatiques de type ELISA sont actuellement les méthodes de référence pour mettre en évidence les anticorps sériques du sujet infecté. C'est une méthode simple, sensible, spécifique, rapide, destinée au dépistage de grandes séries de sérums.

On distingue deux grandes techniques (9) :

- la technique « sandwich » : le sérum à étudier est mis d'abord à incuber en présence du support sensibilisé (microplaque ou bille) ; des complexes antigène-anticorps se forment et leur présence est révélée dans un second temps par l'adjonction d'un sérum antiglobuline humaine marqué par une enzyme ; après une phase de lavage minutieux, le substrat de cette enzyme donnera une réaction colorée d'autant plus intense que le sérum est riche en anticorps.

La technique « sandwich » est la plus sensible ; elle détecte des quantités très faibles d'anticorps, quelle que soit leur origine (env ou core) ; elle met également en évidence des réactions croisées avec le VIH-2, ce qui peut présenter un certain avantage ;

- la technique par compétition : les anticorps anti-VIH de l'échantillon à tester entrent en compétition avec les anticorps du conjugué (sérum anti-VIH marqué par une enzyme), vis à vis des antigènes viraux fixés sur le support solide. Plus la concentration d'anticorps dans l'échantillon est élevée, moins l'antigène fixera de conjugué. Le substrat chromogène donnera une réaction colorée qui sera donc inversement proportionnelle à la concentration en anticorps.

1-8-1-2 Le western blot (test de confirmation) (24, 9)

En cas de test ELISA positif ou incertain, le résultat doit être confirmé par le western blot. Il consiste à la recherche d'anticorps spécifiques contre différentes protéines virales codées par les gènes de structure. Dans la plupart des cas, ce test confirme le test ELISA et met en évidence la réactivité avec toutes les protéines virales. La réactivité isolée à deux protéines (gp160 et gp24/25 ou gp120/110 et gp41) s'observe en cas de séroconversion (dans les 6 à 12 semaines après la contamination). La réactivité à une seule protéine (p25 isolée) peut signifier une séroconversion en cours ou une infection à virus, VIH-2. Chez le sujet qui évolue vers le sida déclaré la réactivité anti-p24 croit. Enfin, l'absence de réactivité au western-blot permet d'affirmer la séronégativité.

Pour l'interprétation, l'OMS recommande pour affirmer, la séropositivité (50) :

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

1-8-1-3 La technique d'agglutination

Elle consiste à coupler artificiellement l'antigène viral à un support particulier (particules de latex). La présence d'anticorps dans le sérum se traduit par une agglutination des particules visibles à l'œil nu. Cette méthode est moins sensible que l'ELISA mais de réalisation très rapide (moins de 30 minutes) ne nécessitant aucun appareillage. C'est cette approche qui est utilisée dans la conception de tests rapides qui constituent un excellent recours en cas d'urgence notamment dans les PVD (54).

1-8-1-4 RIPA

Cette technique met en évidence préférentiellement des anticorps dirigés contre les protéines d'*env* et de ce fait constitue un apport complémentaire d'informations pour les échantillons sériques d'interprétation délicate en western blot.

Le principe utilise un virus marqué par un isotope radioactif (en général la cystéine 35). Le lysat viral contenant les antigènes à l'état natif est incubé avec les sérums à tester. Les complexes immuns formés sont alors captés sur un support d'affinité (tel que des billes de protéines A sepharose). Les antigènes viraux retenus par les anticorps spécifiques sont ensuite élués et séparés en fonction de leur poids moléculaire sur le gel de polyacrylamide. La révélation est effectuée par autoradiographie.

Le RIPA est un test de confirmation très sensible, réservé à des laboratoires agréés (55).

1-8-1-5 IFI

C'est une excellente technique de détection des anticorps dirigés contre les gp membranaires et transmembranaires spécifiques de l'infection par le VIH; mais cette technique est sensible et difficile à standardiser, susceptible d'interprétation erronée et se prête mal au dépistage de routine. Ses principaux désavantages sont la nécessité d'un microscope fluorescent fort coûteux ainsi qu'un personnel de laboratoire bien formé capable de faire la lecture et l'interprétation des résultats (55).

1-8-2 LES METHODES DIRECTES

1-8-2-1 L'antigénémie p24

Test de détection précoce des protéines libres du VIH présentes dans le plasma, il est actuellement recommandé pour le diagnostic précoce des contaminations récentes sans signes clinique ou des primo-infection à VIH. C'est un marqueur direct de l'infection détectable lorsque la charge virale est de l'ordre 10^5 copies d'ARN viral / ml de plasma.

Chez les enfants nés de mères séropositives cette recherche permet un diagnostic précoce et d'instaurer un traitement antiviral et des mesures préventives contre les infections opportunistes. Cette recherche permet de réduire la durée de la « fenêtre immunologique » (9,24).

1-8-2-2 PCR (*polymerase Chain reaction*)

La recherche de l'ADN proviral du VIH-1 ou du VIH -2 dans le réservoir cellulaire repose sur l'utilisation d'une technique de biologie moléculaire, la PCR généralement pratiquée sur des cellules mononuclées du sang périphérique (12). Outil de détection rapide et sensible, la PCR, mise au point en 1985 par Kary Mullis (prix Nobel de chimie 1993) est une technique d'amplification génique (56). Elle permet de repérer un fragment d'ADN ou de gène bien précis et de dupliquer en multiples exemples. La mise en évidence de la région ciblée se fait par amplification enzymatique à l'aide d'une enzyme ADN polymérase thermorésistante (taq polymérase). Cette enzyme est extraite d'une bactérie thermophile (*thermophilus aquaticus*). Le principe et les conditions expérimentales qui en découlent sont très simples. Il s'agit de réaliser une succession de réactions de réplication d'une matrice double brin d'ADN. Chaque réaction met en œuvre deux amorces oligonucléotidiques dont les extrémités 3' pointent l'une vers l'autre. Les amorces ou « primers » en anglais définissent alors, en la bornant la séquence à amplifier.

La technique comporte des cycles successifs. Chaque cycle comprend une succession de 3 phases (56) :

- Une phase de dénaturation par la chaleur (95°C) : les liaisons faibles qui assuraient la cohésion de la double hélice d'ADN sont rompues pour donner deux simples brins d'ADN.

- Une phase d'hybridation (40-65°C) : l'hybridation des amorces sur l'ADN repose sur le principe de l'appariement des bases complémentaires. Le choix de la température est calculé en fonction de la longueur et de la séquence des amorces. Les deux amorces se situent de part et d'autre de l'extrémité 3' du fragment à amplifier. L'hybridation des amorces sur la molécule d'ADN matrice dépend d'une combinaison liant la température, la séquence et la longueur de l'amorce.

- Une phase d'élongation par l'ADN polymérase : les amorces hybridées à l'ADN servent de point de départ à la polymérisation du brin complémentaire de l'ADN matrice. La polymérisation se fait par ajout successif des désoxyribonucléiques. Chaque base ajoutée est complémentaire de la base correspondante du brin matrice. 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 complémentaire à partir de laquelle une nouvelle copie pourra être synthétisée. L'amplification devient donc exponentielle car le nombre de matrice disponible double à chaque cycle. Les différents cycles s'effectuent dans un thermocycleur permettant des changements très rapides de température. Le produit de l'amplification est analysé par électrophorèse sur gel et la séquence amplifiée apparaît sous forme d'une bande visible à l'UV.

La PCR est capable de révéler l'infection avant même les épreuves de détection d'Ag.

La PCR est beaucoup utilisée dans la recherche sur le SIDA pour les cas suivants (57) :

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

De plus la PCR permet de réaliser deux choses intéressantes avec l'ADN :

- 1- la PCR permet de cibler un segment d'ADN particulier dans le génome ;
- 2- la PCR permet d'amplifier ce segment des millions de fois et de le rendre visible.

C'est une méthode extrêmement sensible et spécifique, mais est sujette à de faux positifs ou à de faux négatifs si on ne l'exécute pas avec le plus grand soin. Elle exige une parfaite maîtrise des techniques de laboratoire et constitue un important outil pour la recherche.

1-8-2-3 L'isolement viral (10, 58)

La culture du virus pour isolement est un examen de principe simple mais d'exécution fastidieuse. Il est effectué dans un laboratoire de sécurité P2 à accès contrôlé. L'isolement viral se fait à partir des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) obtenu après séparation par un gradient de densité (ficoll). La culture utilise comme support pour la multiplication virale, une culture des PBMC des donneurs séronégatifs pour le VIH préalablement stimulées à la phytohémagglutinine (PHA) et maintenues dans un milieu de culture contenant l'IL-2. La multiplication du virus dans cette culture est détectée par l'apparition dans le surnageant des Ag P24 de VIH-1 ou plus universellement par l'apparition d'une activité rétrotranscriptase. On maintient la culture en bon état (sans souillure) pendant 3 à 4 semaines, en changeant régulièrement le milieu de culture. La recherche d'une virémie à partir des PBMC de patients (virémie cellulaire) est presque toujours positive tandis que la virémie plasmatique n'est régulièrement positive qu'aux stades avancés de l'infection.

Les trois principales indications de l'isolement en culture de PBMC sont restreintes :

- au diagnostic de l'infection périnatale;
- aux cas d'infection atypique en ce qui concerne les résultats des examens sérologiques, la clinique ou l'épidémiologie;
- à la mise en place et le suivi des essais cliniques pour l'obtention de la souche en vue de l'étude de la sensibilité des souches aux antiviraux.

Il faut reconnaître à cette technique le mérite historique d'avoir identifié le virus causal du sida. L'isolement viral est une technique coûteuse en temps et en moyen, du fait de la durée de la culture et des moyens mis en œuvre pour détecter le virus.

1-9 TRANSMISSION DU VIH (59)

Le VIH se transmet d'une personne à l'autre par relation sexuelle vaginale et anale, par le partage d'aiguilles et de seringues contaminées, et par la transfusion de sang et de produits sanguins infectés. On est parvenu à isoler le virus dans la salive, les larmes, l'urine et les sécrétions bronchiques. Toutefois, aucune infection n'a été signalée dans le cas de personnes qui ont eu un

contact direct avec ces fluides biologiques ou ces sécrétions. Malgré tout, la transmission du virus demeure possible si les fluides en question sont contaminés par du sang infecté au VIH. Les risques d'infection par transfusion de sang ou de produits sanguins ont considérablement diminué grâce à la mise en place de mesures comme la sélection rigoureuse des donneurs, la vérification des unités sanguines recueillies pour déceler le VIH. Les infections causées par d'autres maladies sexuellement transmissibles, en particulier celles qui provoquent des ulcérations, peuvent favoriser la transmission du VIH.

Le VIH peut se transmettre de la mère enceinte à son enfant, durant le troisième trimestre de grossesse ou lors de l'accouchement. Ce risque de transmission varie de 15% à 30% si la mère ne suit aucun traitement, et est d'autant plus élevé que son état général est faible ou si son taux de CD4 est inférieur à 200/mm³. En revanche le risque est considérablement diminué si elle suit un traitement antirétroviral pendant la grossesse, pouvant chuter en-dessous de 5%.

En outre, la transmission par l'allaitement maternel étant avérée, celui-ci doit être interdit dans la mesure du possible.

1-10 PREVENTION (3)

Les éléments de la prévention intégrée au VIH comprennent :

- un programme de changements des comportements, notamment pour les jeunes et les populations à risque accru d'exposition au VIH, ainsi que pour les personnes vivant avec le VIH;
- La promotion des préservatifs masculins et féminins, qui constituent une option de protection, au même titre que l'abstinence et la fidélité;
 - le conseil et le test volontaire;
 - la prévention et le traitement des infections sexuellement transmissibles;
 - la prévention primaire parmi les femmes enceintes et la prévention de la transmission mère enfant;
 - les programmes de réduction des risques à l'intention des consommateurs de drogues injectables;
 - les mesures de protection de la sécurité de sang;

- la réduction de la vulnérabilité par le biais des changements sociaux, juridiques et économiques.

La prévention du VIH doit évoluer et devenir plus innovatrice pour faire face à l'évolution de l'épidémie. Dans plusieurs pays à revenu élevé, les comportements à risque et les nouvelles infections sont à nouveau en hausse en particulier chez les jeunes hommes homosexuels. Ce phénomène est probablement lié à la lassitude qui entoure la prévention et au laisser-aller du à l'accessibilité et aux promesses des thérapies antirétrovirales.

Des programmes complets de prévention permettraient d'éviter 29 des 45 millions de nouvelles infections qui se produiront au cours de cette décennie.

1-11 LES ANTIRETROVIRAUX (24, 60)

Les antirétroviraux constituent un groupe de médicaments anti-infectieux antiviraux actifs sur le VIH. Il s'agit de médicaments essentiellement virustatique qui agissent par inhibition enzymatique.

Le but du traitement est d'obtenir une charge virale la plus faible possible ou au-dessous du seuil de détection afin de prévenir ou retarder la résistance. Le taux de lymphocytes CD4 et la charge virale sont des témoins de l'efficacité du traitement et de l'évolution de l'infection. La première molécule antivirale, la Zidovudine a été homologuée en 1987. Dans les années suivantes, d'autres nouveaux médicaments de la même famille ont été introduits. En 1996, une autre famille fut disponible, Les inhibiteurs de la protéase. Il existe actuellement une vingtaine de molécules antirétrovirales appartenant à quatre classes définies selon leur mode d'action (inhibiteurs nucléosidiques de la reverse transcriptase, inhibiteurs non nucléosidiques de la reverse transcriptase, inhibiteurs de la protéase et inhibiteurs de la fusion). Celles-ci ont pour cible deux enzymes nécessaires à la réplication du virus :

- la transcriptase inverse, sur laquelle agissent deux familles thérapeutiques, les inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse et les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse.

- la protéase sur laquelle agissent les inhibiteurs de la protéase. Ces inhibiteurs ont fait naître de nouveaux espoirs par la trithérapie. En effet la trithérapie a donné des résultats impressionnants à court terme, réduisant à la

fois la morbidité et offrant réellement aux personnes vivant avec le SIDA l'espoir d'une vie meilleure et plus longue.

Les principaux inhibiteurs nucléosidiques de la reverse transcriptase (INRT):

- Zidovudine (AZT, ZDW) Retrovir®
- Didanosine (ddi) Videx®
- Zalcitabine (ddc) Hivid®
- Stavudine (d4T) Zerit®
- Lamivudine (3TC) Epivir®
- Abacavir (ABV) Ziagen®

Les principaux inhibiteurs non nucléosidiques de la reverse transcriptase (INNRT) :

- Névirapine Viramune®
- Efavirenz Sustiva®, Stocrin®
- Délavirdine Rescriptor®

Les principaux inhibiteurs de la protéase (IP) :

- Indinavir Crixivan®
- Ritonavir Norvir®
- Saquinavir Invirase®
- Nelfinavir Viracept®
- Amprénavir Agénérase®
- Lopinavir Kaletra®

Les inhibiteurs de fusion et d'entrée :

On distingue plusieurs mécanismes d'inhibition de l'entrée du VIH :

- les inhibiteurs de la liaison au récepteur CD4
- les inhibiteurs des récepteurs aux chimiokines : antagoniste CXCR4 ou CCR5
- les inhibiteurs de la fusion VIH / membrane cellulaire de l'hôte :

Enfuvirtide (Fuzéon®) : polypeptide de 36 acides aminés administré par voie sous-cutanée.

Malheureusement du fait de sa grande hétérogénéité, le virus du SIDA est capable d'adapter son code génétique de manière à échapper à l'effet des ARVs. La résistance aux ARVs n'apparaît que lors de la réplication du virus et c'est pourquoi l'un des principaux objectifs du traitement consiste à réduire la

multiplication du virus le plus durablement possible en associant plusieurs molécules ARVs.

L'association de deux inhibiteurs nucléosidiques de la RT et d'un inhibiteur non nucléosidiques est une alternative efficace permettant de retarder l'introduction des inhibiteurs de la protéase.

En théorie, de nombreuses combinaisons thérapeutiques sont possibles. Celles-ci doivent tenir compte des interactions pharmacologiques, des effets secondaires, des données de résistances croisées entre les molécules, de la complémentarité d'activité et de la puissance des molécules utilisées.

Le traitement antirétroviral ne permet pas d'éradiquer le VIH qui persiste à l'état latent dans les cellules infectées.

Au Mali, le schéma thérapeutique homologué au niveau de l'IMAAR (Initiative Malienne d'Accès aux ARVs) est le suivant :

2 INRT et 1INNRT ou 2 INRT et 1IP.

1-12 APPROCHES VACCINALES

Le premier essai vaccinal contre le VIH a été réalisé en 1987 aux USA. Depuis de nombreux concepts et candidats vaccins sont en élaboration mais aucun n'a dépassé les essais de phase III.

Même si dans les années 90, des scientifiques doutaient de la faisabilité d'un vaccin efficace contre le VIH (**61**), de nombreux chercheurs s'acharnent encore aujourd'hui à trouver ce vaccin. Développer un vaccin contre le VIH est un processus de longue haleine. Le schéma classique est d'identifier les types de réponses immunologiques qui pourraient protéger de l'infection à VIH, et développer des vaccins expérimentaux capables d'induire ces réponses (**62**).

Mais dans le cas du VIH, la difficulté réside dans le fait que le SIDA n'est pas une infection comme les autres, et sa complexité en a dérouté plus d'un. Les caractéristiques principales de l'infection qui rendent difficile la conception d'un modèle vaccinal sont (**63**) :

- la diversité génétique du VIH-1 entraîne la nécessité d'élaborer un vaccin capable d'affronter cette variabilité et d'induire des anticorps neutralisants et des réponses cellulaires CD4/CD8 capables de protéger les vaccins contre les souches circulantes.

- La difficulté d'induire une réponse humorale en utilisant des anticorps anti-VIH neutralisants dirigés contre les régions les plus conservées de l'enveloppe virale.
- Le polymorphisme du système HLA qui complique la conception d'un candidat vaccin induisant une réponse cellulaire (CTL) protectrice. L'infection s'accompagne de l'inhibition des molécules HLA à la surface des cellules infectées, les rendant ainsi invisibles aux CTL.
- La voie de contamination majeure est trans-muqueuse alors que peu de choses sont connues sur l'immunité muqueuse pour obtenir une immunité locale efficace.

Deux types de stratégies existent pour la mise au point d'un vaccin anti-VIH : la stratégie prophylactique et la stratégie thérapeutique. Le vaccin prophylactique induira des anticorps neutralisants pour bloquer l'entrée du virus. Or, au vu des difficultés pour l'obtention de ces anticorps, les chercheurs s'orientent plutôt vers le vaccin thérapeutique qui permettra un contrôle de la réplication virale par le système immunitaire et donc d'éviter le développement d'un SIDA (64). Ce vaccin induira une réponse lymphocytaire CD8+ et également CD4+. Une bonne réponse CD8+ est indispensable car elle permet le contrôle de la charge virale chez les primates infectés (62) et est inversement corrélée avec une faible charge virale plasmatique chez l'homme (65). Quant aux CD4+, la présence d'une réponse proliférative T CD4+ va permettre le maintien à long terme des réponses T CD8+ anti-VIH (66) ainsi que le maintien d'une charge virale faible chez les patients LTNP (Long Term Non-Progressor) (24).

1-12-1 LES CANDIDAT-VACCINS A VECTEUR

Il s'agit d'une approche vaccinale utilisant divers micro-organismes vivants (virus, bactéries) en vue de transporter vers l'organisme un gène ou plusieurs gènes du VIH. Habituellement, ces vecteurs sont vivants, c'est-à-dire qu'ils fabriquent des copies d'eux-mêmes. Lorsqu'ils font ces copies, ils copient aussi les gènes du VIH qui avaient été sélectionnés et insérés dans le vecteur. Le système immunitaire détecte les protéines produites par ces gènes et, comme il le fait après toute vaccination, il orchestre une simulation de réponse immunitaire.

1-12-1-1 Les vecteurs bactériens

Trois types de bactéries sont utilisés comme vecteur dans l'optique d'une vaccination anti-VIH :

- les salmonelles : sont utilisées en vaccination anti-SIV chez le macaque. Elles permettent d'exprimer la gp120 qui est capable d'induire des anticorps chez la souris mais la présence de CTL n'a pas été détectée (67).

Un vecteur *Salmonella typhi* exprimant la protéine Env est en cours d'essai ; il a été mis en évidence que ces bactéries pouvaient servir comme vecteur de transport de l'ADN et cette approche s'est avérée plus immunogène que la première (68).

- les BCG : cette souche atténuée de *Mycobacterium bovis* est utilisée depuis longtemps comme vaccin efficace contre la tuberculose. L'utilisation du BCG comme vecteur a été proposée dès 1997 par les chercheurs de l'Institut National des maladies infectieuses (NID) du Japon travaillant en collaboration avec les experts de l'OMS. Le BCG devrait être utilisé pour préparer un vaccin exprimant les protéines de la boucle V3. Des essais de vaccination muqueuse ont été réalisés chez la souris et le macaque. Les résultats obtenus donnaient de bonnes réponses anticorps et CTL locales chez la souris (69) ainsi que des réponses humorales et cellulaires chez le macaque (70).
- Des souches atténuées de *Listeria* ont aussi été testées. Une étude récente chez la souris rapporte que ce vecteur induit de bonnes réponses CTL systémiques et muqueuses. Cette étude montre

également une protection contre une inoculation parentérale ou muqueuse de virus de la vaccine exprimant la protéine gag du VIH après une immunisation intraveineuse avec ce vecteur (71).

1-12-1-2 Les vecteurs viraux

Des vecteurs viraux sont en cours d'étude chez l'animal. On peut citer le virus vénézuélien de l'encéphalite équine (VEE) qui induit des réponses cellulaires et humorales chez la souris (72).

1-12-1-2-1 Les vecteurs poxvirus

Les poxvirus avec la vaccine sont utilisés dans la conception d'un vaccin. Les poxvirus représentent de bons candidats vaccins de part leur grande capacité de croissance permettant la production de stocks importants de virus, leur grande capacité d'insertion d'ADN étranger. Aussi, ils ne se répliquent que dans le cytoplasme des cellules, limitant les risques d'intégration ou de recombinaison génique avec l'ADN de l'hôte. C'est ainsi qu'on distingue le MVA (Modified vaccinia virus Ankara), un variant de la vaccine, développé en vue d'éradiquer la variole, a fait l'objet de nombreuses recherches et ses résultats sont assez prometteurs chez les primates. L'immunisation des macaques par un MVA-VIS a permis d'observer le maintien d'une faible réplication virale (73); de même un autre MVA exprimant les gènes *gag* et *pol* a entraîné une réduction de la virémie plasmatique (73,74).

1-12-1-2-2 le canarypox

Le canarypox, un poxvirus aviaire dont les préparations vaccinales sont représentées par les candidats vaccins ALVAC développés par Aventis Pasteur avec le soutien de l'ANRS (Vcp125, Vcp205.....). Il est de loin le vecteur le plus utilisé. Le canarypox ne se réplique pas chez les mammifères et donc naturellement atténué chez l'homme (72). L'utilisation de canarypox a montré après infection dans le modèle macaque/SIV l'induction de CTL jouant un rôle dans le contrôle précoce mais aussi plus tardif de la virémie et permettant ainsi l'établissement d'une infection chronique contrôlée (75).

1-12-1-2-3 Le Picornavirus

Le Picornavirus, un recombinant du virus Sabin de la poliomyélite a aussi été testé chez des primates. Les essais d'immunisation du macaque par voie nasale ont mis en évidence une protection partielle de la majorité de ces animaux contre l'infection à VIS (76). Le vaccin s'est montré très efficace chez les primates car il a permis le contrôle de la virémie de tous les macaques infectés vaginalement par un SIV. Les vecteurs utilisés dans cet essai contenaient des séquences des gènes SIV *gag*, *pol*, *env*, *nef* et *tat*.

Chez le macaque, d'autres essais ont eu lieu avec des « vesicular stomatitis » recombinants atténués. Ces virus infectent les animaux et non les hommes (exceptés certains peuples en contact avec des animaux contaminés) ce qui en fait un bon candidat vaccin. Ce vecteur exprimant les gènes *env* de VIH-1 et *gag* du SIV, et injecté par voie intramusculaire et intranasale induit des réponses cellulaires et humorales et permet un très bon contrôle de la charge virale jusqu'à 14 mois après infection des macaques par un SHIV (77).

1-12-2 VACCINS UTILISANT L'ADN

L'immunisation génétique est une technique récente dans les stratégies de vaccination. Elle combine un ou plusieurs gènes et/ou segment de gène dans un ADN nu. Leur injection en IM ou SC conduit à l'incorporation de cet ADN dans les cellules avec pour conséquence la production d'antigène suivie de l'induction d'une réponse immunitaire. Des essais ont été concluants chez la souris et le primate non humain avec l'induction des réponses cellulaires et humorales (78). La vaccination a fait son apparition chez l'homme en essai de phase I préventif chez les patients infectés par le VIH-1 (79). Cette étude a montré l'induction de réponses cellulaires cytotoxiques mais l'interprétation des résultats reste difficile étant donné le statut séropositif des individus.

Malgré les avantages de ce type de vaccin (induction d'anticorps et de réponses cellulaires T CD4+ et T CD8+ spécifiques) l'intégration du vecteur dans le génome reste un risque non négligeable. En effet deux cas de cancers (leucémie) sont survenus lors d'un essai de thérapie génique mené en France (80).

1-12-3 VACCINS UTILISANT LES PEPTIDES

L'idée d'utiliser des séquences peptidiques courtes immunogènes provenant de plusieurs protéines de VIH pour induire des réponses cellulaires spécifiques trouve son origine dans des travaux qui remontent à la fin années 80. A cette époque, les immunologistes avaient élucidé les bases moléculaires du phénomène de restriction par le CMH (81).

Les lymphocytes reconnaissent un antigène étranger lorsqu'il est présent sous forme de peptides à la surface d'une cellule en association avec le CMH de classe I ou de classe II. C'est ainsi qu'est née l'idée de concevoir un système de vaccination consistant en l'inclusion d'épitopes, à savoir ceux reconnus par les lymphocytes T CD8+. Pour éviter le risque d'échappement, il a fallu sélectionner les épitopes immunogènes dans les régions les plus conservées du VIH. Les critères de sélection des peptides étaient (81) : une forte affinité pour les molécules de classe I, la capacité à former un complexe stable avec ces molécules, la capacité à induire une activité cytolytique CTL. Le même type de travail a été ensuite réalisé pour les épitopes CD4+ et se fixant aux molécules de classe II.

Les premières expériences utilisant comme immunogène des peptides ont pu montrer chez la souris l'importance de la présence d'un épitope T CD4+ (helper) dans l'immunogène pour permettre l'induction d'une réponse CTL mémoire à terme (82).

Concernant le VIH, des expériences ont montré chez la souris et le macaque qu'une vaccination peptidique permettait l'induction de CTL et une protection contre la maladie (SIDA) après une infection par un virus de la vaccine recombinant exprimant la gp160 pour la souris (83), et un SHIV (KU-2) pour le macaque (84).

Le problème de la stratégie peptidique est la faible immunogénéicité des peptides injectés seuls. Les recherches s'orientent ainsi vers la combinaison de plusieurs peptides capables d'immuniser contre diverses régions antigéniques du virus (85).

1-12-4 VACCINS UTILISANT LES LIPOPEPTIDES

Les lipopeptides sont actuellement utilisés dans des essais vaccinaux car ils induisent des réponses cytotoxiques des lymphocytes T CD8, à l'inverse des peptides seuls. Les lipopeptides sont des molécules hybrides constitués de

larges fragments synthétiques de protéines virales associées à une chaîne lipidique. La partie lipidique assure une meilleure pénétration intracellulaire du peptide dans les CPA (cellules dendritiques), favorisant ainsi la réponse immunitaire cellulaire (81). Cette approche a été développée par l'ANRS EN 1994 visant à induire une réponse cellulaire multiépitopique par l'administration des lipopeptides.

Une première étude *in vivo* réalisée chez la souris a permis de démontrer le potentiel immunogène des lipopeptides (86). Les auteurs de ce travail ont comparé la capacité à induire des réponses cytolytiques CTL entre les peptides synthétiques et les lipopeptides simples contenant le même épitope T immunodominant de la protéine gp160 du VIH. Alors que les peptides libres étaient peu immunogènes, les lipopeptides ont induit de fortes réponses CTL primaires. Des lipopeptides de 16 à 34 aa étaient aussi efficaces, indiquant que plusieurs épitopes pouvaient être inclus dans une seule construction. Des réponses T helper (activation des lymphocytes CD4+) ainsi que des réponses B (production d'anticorps) ont également été obtenus(81).

Après endocytose, les différents épitopes contenus dans le lipopeptide sont présentés en association avec les molécules du CMH de classe I par les cellules dendritiques aux lymphocytes T CD8+ spécifiques.

Un mélange de 7 lipopeptides synthétisés à partir des séquences de régions immunogènes connues des protéines nef et gag du virus de SIV a été injecté à des macaques. Les animaux ont présenté des réponses CTL spécifiques et fonctionnelles, détectables jusqu'au moins 10 mois après l'injection. Des anticorps ont également été observés chez tous les animaux. Une autre étude a montré une forte réponse CD4 corrélée à l'induction d'une réponse multiépitopique CD8. Les lipopeptides sont ainsi capables d'induire des réponses B et T chez le primate.

Chez l'homme, l'utilisation d'un lipopeptide constitué d'un épitope T CD8 du virus de l'hépatite B (HBV), d'un épitope T CD4 de la toxine tétanique dit universel car pouvant se lier à plusieurs molécules différentes du CMH de classe II, et de 2 molécules d'acide palmitique a permis l'induction de CTL.

Actuellement des vaccins lipopeptidiques anti-VIH sont en essai de phase I chez l'homme. Les premiers résultats de l'essai ANRS Vac04 ont pu montrer

l'induction de réponses B et T polyépitopiques de longue durée (plus de 2 ans) après 3 injections de 6 lipopeptides (**87, 88**). La plupart de ces essais associent les lipopeptides à un vecteur viral dans lequel sont insérés des gènes qui codent pour les mêmes séquences que celles que l'on retrouve dans les lipopeptides. Les lipopeptides apparaissent aujourd'hui comme de bon candidats vaccins puisqu'ils montrent une bonne efficacité en terme de réponse cellulaire.

1-12-5 VACCINS VIVANTS ATTENUÉS (89)

Historiquement, les vaccins renfermant des germes vivants atténués ont fait la preuve de leur efficacité pour ce qui est d'induire et maintenir une immunité à long terme contre les maladies telles que la rougeole, la fièvre jaune et la tuberculose. Pour le VIH, compte tenu de l'extrême variabilité de virus, la garantie d'une atténuation sans danger n'a pas encore été véritablement obtenue chez l'homme.

Chez les primates, un vaccin vivant atténué a été utilisé avec succès pour protéger ces animaux contre l'infection à VIS.

1-12-6 VACCINS A BASE DE VIRUS TUES OU INACTIVES (89)

C'est une autre approche répandue. Les virus vivants inactifs ont fait preuve de leur efficacité dans les formulations vaccinales telles que le vaccin contre la poliomyélite, le choléra, ainsi que la grippe. Cependant le risque d'inactivation incomplète des germes utilisés dans ces préparations a fait surface concernant le VIH. D'autres part, les chercheurs ont mis en évidence l'existence de risques de perturbation de la structure des épitopes de neutralisation du virus lorsqu'on lui applique les procédés d'inactivation utilisés pour préparer de tels vaccins. Les préparations vaccinales de ce type, outre les études pré-cliniques, n'ont pas fait l'objet d'études approfondies pour évaluer les risques liés à leur usage chez l'homme.

Des essais de vaccination ont été réalisés chez le macaque. Ils ont donné de faux espoirs en voyant que les macaques étaient protégés contre l'infection avec une souche sauvage (**90**). Cette protection était due au fait que le SIV était cultivé dans des cellules humaines et que les macaques répondaient à des antigènes humains (**91**). L'immunisation avec des cellules humaines non

infectées ou des molécules humaines du CMH aboutissait aussi à une protection relative de macaque. Après préparation du SIV sur des cellules de macaques, la vaccination n'a induit aucune protection **(92)**.

1-12-7 LE VACCIN GAIA (GAIA VACCINE)

Le vaccin GAIA est un projet de recherche de vaccins anti-VIH, initié par le Dr Anne DeGroot chercheur au laboratoire de recherche sur la tuberculose et le VIH de l'université Brown. Ce vaccin doit inclure les différents épitopes conservés et immunogènes pour toutes les souches circulantes dans le monde. Pour cela, grâce à la bioinformatique (Conservatrix et Epimatrix) des épitopes largement conservés, pouvant se fixer sur les molécules HLA ont été identifiés et sélectionnés pour la recherche vaccinale. Ces épitopes sont repartis en deux classes : classe I et classe II du HLA.

Un programme de collaborations avec les chercheurs maliens a été élaboré en vue de la sélection d'épitopes au Mali.

Le but de la recherche du vaccin GAIA serait **(93)** :

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

METHODOLOGIE

2- MATERIELS ET METHODES

2-1 LIEUX D'ETUDE :

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

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

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

2-1-2-1 Le personnel :

Le CNTS est dirigé par :

- un directeur, spécialisé en immuno-hématologie et en transfusion sanguine. Il est chargé de la coordination de toutes les activités du centre;
- Un spécialiste en Immunologie (pharmacien), un médecin avec CES Immunologie et Hématologie, un médecin avec DES Immunotransfusion;
- des techniciens diplômés d'Etat, chargés des analyses biologiques;
- un comptable, deux gestionnaires et deux secrétaires de direction.

2-1-2-2 Le local :

Le CNTS est composé de deux bâtiments reliés par un passage couvert. Le bâtiment sud abrite la cuisine et la salle de collation des donneurs de sang; le bâtiment nord comprend trois parties : une partie administrative, une partie réservée à l'accueil, à l'entretien avec le donneur, la salle de garde et la préparation des produits sanguins et une partie destinée aux laboratoires de validation biologique des produits sanguins et leur conservation.

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

Le LBMA est situé sur la colline de Badalabougou en commun V du district de Bamako, dans l'enceinte de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université de Bamako.

2-1-3-1 Le personnel :

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

- des pharmaciens à tendance biologiste qui sont responsables des différentes unités et de l'encadrement des travaux pratiques pour les étudiants en maîtrise de Biochimie-Microbiologie et Sciences Biologiques de la FAST, des étudiants en année de thèse de la faculté de médecine de Pharmacie et d'Odonto-stomatologie (FMPOS) et des auditeurs de DEA option Entomo-Parasitologie de la FAST;
- des techniciens diplômés d'Etat, chargés des analyses biologiques;
- des médecins;
- des ingénieurs agronomes;
- Une secrétaire de direction.

2-1-3-2 Le local

Le LBMA est composé de trois bâtiments :

- un bâtiment au sud qui abrite la salle de Biotechnologie végétale, la salle de culture cellulaire et la salle de génomique fonctionnelle;
- deux bâtiments au nord, le premier est destiné à la parasitologie et la biologie clinique, le second à la virologie.

2-2 TYPE ET PERIODE D'ETUDE :

Il s'agissait d'une étude prospective à visée investigatrice, qui s'est déroulée entre Août 2003 et Octobre 2005.

2-3 POPULATION D'ETUDE

L'étude a porté sur des donateurs volontaires consentants et dont le sang à été prélevé pendant la matinée au CNTS (voir fiche de consentement éclairé en annexe).

Notre travail a porté sur 40 donateurs répartis en 2 groupes :

- **groupe A** : groupe témoin constitué de 5 donateurs séronégatifs au VIH mais séropositifs à l'hépatite B ou C ;
- **groupe B** : groupe cible constitué de 35 donateurs séropositifs;

2-3-1 Critères d'inclusion :

Ont été inclus dans notre étude, les donateurs de sang volontaires consentant et dont la durée de conservation du prélèvement sanguin n'avait pas dépassé 6 heures.

2-3-2 Critères de non inclusion :

N'ont pas été inclus dans notre étude :

- les donateurs de sang volontaires non consentants ;
- les donateurs de sang volontaires séropositifs au VIH dont la poche de sang a été conservée pendant plus de 6 heures.

2-4 PREPARATION DES ECHANTILLONS AU CNTS

Le prélèvement était effectué au pli du coude après désinfection correcte de la peau chez chaque sujet. Le sang était recueilli dans des poches stériles contenant du citrate de sodium.

2-5 TRANSPORT DES ECHANTILLONS AU LBMA

Après la détection de la séropositivité par l'ELISA, la poche était rapidement transportée dans un sac thermostable pour agent infectieux (Timber Creek™) avec des blocs réfrigérants. Le transfert des poches se passait en moins d'une heure entre le CNTS (Quinzambougou) et le LBMA (Colline de Badalabougou).

2-6 CRITERES D'ACCEPTABILITE DE L'ECHANTILLON

Toute poche transportée au LBMA devait répondre aux critères suivants avant d'être accepté comme échantillon d'étude :

- la durée entre le prélèvement du sang et la réception au LBMA ne devait pas dépasser 6 heures.
- l'absence d'hémolyse et de culots dans le prélèvement sanguin.

2-7 BONNES PRATIQUES DE LABORATOIRE

Les précautions suivantes ont été observées pendant toutes les procédures :

- Toutes les manipulations qui nécessitent une stérilité absolue ou pouvant créer des éclaboussures ou des aérosols doivent être faits sous la hotte dans la salle de culture.
- Les équipements de protection individuels sont exigés (Gants, Blouse à usage unique, Masque de protection, Chaussures fermées).
- Un stock d'ARVs était disponible, pouvant être administré en cas d'accident au laboratoire.

2-8 TECHNIQUE DE LYMPHOSEPARATION (préparation des cellules) :

2-8-1 PRINCIPE

Il consiste à séparer les cellules mononucléées périphériques par centrifugation sur gradient de densité en utilisant le Ficoll (Lymphoprep, Oslo, Norvège). Le sang dilué avec le milieu RPMI (HYQ- RPMI 1640 Hyclone, Logan, Utah) est transféré sur la solution de Ficoll en prenant soin de ne pas les mélanger. Une centrifugeuse à vitesse faible permet d'avoir plusieurs couches cellulaires superposées selon leur densité. Les hématies et les granulocytes (plus dense) forment un culot au fond du tube. La couche des cellules mononucléées périphériques (anneau blanchâtre assez opaque) se forme juste à l'interface Plasma-Ficoll. Les cellules sont récoltées par aspiration puis lavées avec du PBS (Phosphate Buffer Saline, DPBS, Hyclone, Logan, Utah) pour éliminer toute trace de la solution de Ficoll, de plasma, des autres cellules et des débris.

2-8-2 PROCEDURE DE RECUEIL DES CELLULES MONONUCLEES PERIPHERIQUES

La démarche suivante a été adoptée :

- Diluer 30 ml de sang avec 15 ml de RPMI dans deux tubes stériles de 50 ml, inverser soigneusement pour bien mélanger ;
- Dans deux nouveaux tubes stériles de 50 ml, pipeter 15 ml de Ficoll dans chaque tube, et ajouter doucement 30 ml de sang ;
- fermer les tubes et les centrifuger à 2200 rotations par minute (rpm) pendant 20 min (sans frein à la température ambiante)
- A l'aide d'une pipette de transfert stérile, recueillir les cellules en effleurant la surface de la couche et en parcourant la circonférence du tube ; puis les transférées dans un nouveau tube de 50 ml stérile.
- Faire deux lavages successifs avec du RPMI en centrifugeant à 1400 rpm pendant 7 min (frein maximum).
- Rejeter le surnageant pour recueillir le culot des cellules mononucléées périphériques.

2-8-3 COMPTAGE DES CELLULES MONONUCLEES VIVANTES

Le comptage des cellules mononucléées vivantes était effectué dans un hématocytomètre (Hausser scientific, Horsham, PA, USA) à l'aide d'un microscope optique, (Nikon Model Eclipse E400, Japon). La proportion de cellules vivantes était déterminée par le nombre de cellules non colorées par le trypan bleu dilué.

La procédure suivante a été adoptée :

- Ajouter 8 ml du milieu R20 (stable pendant un mois au réfrigérateur entre 2-8°C) sur le culot et mélanger en tapotant le fond du tube jusqu'à obtenir une suspension homogène.
 - **Préparation du milieu R20** : 400ml de RPMI, 20ml de Serum Humain (Human Serum Type AB, Valley Biomedical, In.), 2,5 ml de Penicilline-streptomycine (Sigma, St Louis, Mo) et 0,5 ml de Gentamycine (50 mg/ml ; Gibco™, Invitrogen Corporation, Chine).

- Transférer dans un tube stérile de 1,5 ml 20 µl de cette suspension puis ajouter un volume égal de Trypan bleu dilué au 1/5.
- Bien mélanger en pipetant plusieurs fois.
- Transférer 10 µl de cette solution dans la cellule de l'hématocytomètre
- Compter les cellules viables et ajuster la concentration à deux millions de cellules par ml de sang (2×10^6 cellules/ml) dans du R20.
- Dix ml de cette suspension était immédiatement utilisée pour l'ELISpot et le reste était conservé à -80°C pour le typage HLA dans des tubes de 1,5 ml sous forme de culot sec.

2-9 ENZYME LINKED IMMUNOSPOT (ELISpot)

L'ELISpot est une technique immunoenzymatique de diagnostic in vitro permettant la détection des cellules T sécrétant de l'interféron- γ en réponse à une activation par les antigènes viraux (VIH-1). Son principe consiste à capturer la sécrétion de molécules par les cellules sur un support solide sensibilisé. Après élimination des cellules, l'immunocomplexe est révélé par une méthode Elisa utilisant un substrat dont la précipitation génère des tâches colorées ou immunospots.

2-9-1 PROCEDURE:

2-9-1-1 Préparation des plaques :

Nous avons utilisé des plaques de 96 puits pré-sensibilisées par un anticorps monoclonal anti-IFN- γ de souris : IgG1 purifié (mAb1-D1K, MABTECH, Suède) à la concentration de 1µg/ml dans du PBS (Phosphate Buffer Saline, DPBS, Hyclone, Logan, Utah). Après un lavage minutieux par du PBS répété 4 fois, la plaque a été bloquée pendant 1heure au moins par le milieu de culture nommé R10 et incubé dans un incubateur à CO_2 (Sweldon manufacturing, Inc.) avec une humidité relative de 80%, une température de 37°C et le gaz CO_2 à 5% pendant 1h.

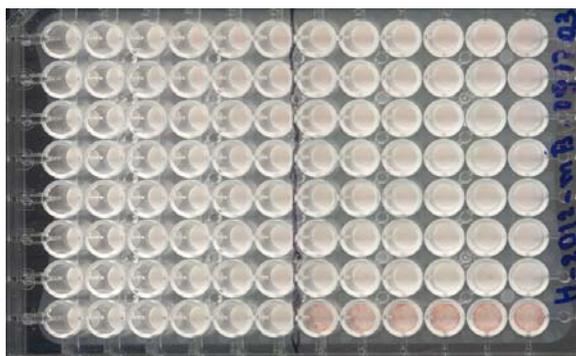


Figure 9 : Exemple d'une plaque de 96 puits pré-sensibilisée

2-9-1-2 Dilution de peptides :

Durant cette incubation, les peptides sous forme lyophilisée étaient solubilisés dans du Diméthyl-sulfoxyde (DMSO, Sigma, St Louis, Mo) et dans du RPMI 1640 à la concentration stock de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

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

2-9-1-3 Incubation des cellules :

Après avoir rejeté le milieu de culture, 100 μl de cellules (soit 200.000 cellules/puits) sont ajoutés à 100 μl de peptides déjà dans les puits. Pour éviter toute évaporation, la plaque a été recouverte d'une feuille d'aluminium puis incubée dans les mêmes conditions que précédemment pendant 18 heures pour les peptides de classe I et 21 heures avec les peptides de classe II.

2-9-1-4 Détection des spots :

Après cette incubation, le contenu de chaque puits est rejeté et chaque puits était lavé avec 200 μl du PBS-Tween (250 μl de Tween 20, dans 500 ml de

PBS). Ensuite deux lavages ont été effectués avec du 1X PBS (DPBS, Hyclone, Logan, Utah).

Cent μ l du second anticorps biotinylé anti-IFN- γ de détection (mAb 7-B6-1-biotin MABTECH, Suède) dilués à 1 μ g/ml dans du PBS- BSA 5% (Bovin Serum Albumin, Pierce) et filtrés avec un filtre de 0,22 μ m à l'aide d'une seringue de 30 ml sont ajoutés dans chaque puits de la plaque. La plaque a été ensuite incubée pendant 2 heures à 37°C. Après fixation de l'anticorps terminal, nous avons lavé 5 fois avec du PBS-Tween 0,05% puis une fois avec du PBS. Après ce lavage, 100 μ l du complexe enzymatique avidine –peroxydase (PBS-Tween 0,01% plus une goutte des solutions A et B ; Vectastain ABC Peroxydase Kit, Vector Laboratories) ont été logés dans chaque puits et la plaque a été ensuite incubée pendant une heure à la température ambiante. Cette incubation était suivie de deux lavages par du PBS-Tween 0,05 % et 3 fois par du PBS.

2-9-1-4-1 Préparation du Substrat (solution tampon d'acétate) :

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

Préparer la solution tampon d'acétate avec :

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

Le substrat a été enfin ajouté et incubé pendant 4 minutes à la température ambiante. La réaction était arrêtée avec 5 lavages de la plaque à l'eau de robinet en prenant soin d'enlever le plastique de sécurité. La plaque a été séchée à l'obscurité pendant toute la nuit.

2-9-1-5 Comptage des spots et Interprétation des résultats :

Après séchage de la plaque, les spots étaient comptés à l'aide d'une loupe (*Stemi SV6*). Une réaction était dite positive lorsqu'il y avait 20 spots pour 1 million de cellules soit 4 spots pour les 200 000 cellules mises en incubation. Les résultats étaient exprimés en nombre de spots formés par cellules par unité (SFC/ 10^6 cellules).

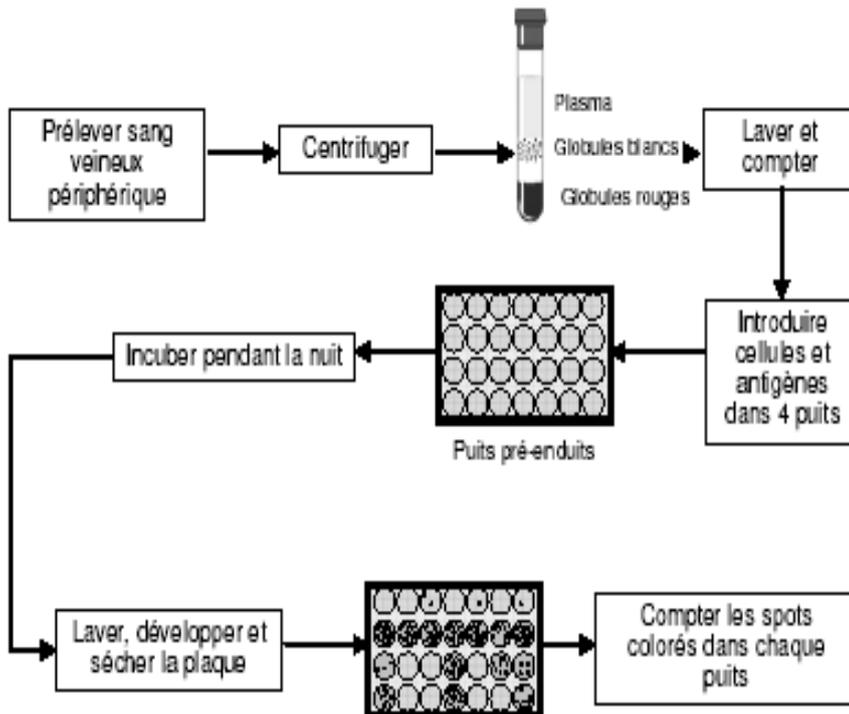


Figure 10 : Diagramme illustrant les principales étapes de l'ELISpot

2-10 TYPAGE HLA

2-10-1 PRINCIPE :

La méthode Sequence Specific Primers (SSP) utilise des amorces spécifiques d'un allèle lors de la réaction d'amplification. Elle repose sur le principe selon lequel seules les amorces dont les séquences sont totalement complémentaires de la séquence cible d'un échantillon d'ADN se lient à cet ADN et donnent un produit d'amplification lors d'une réaction de PCR. Les

amorces non complémentaires ne se lient pas à l'ADN et il ne se produit pas d'amplification.

L'ADN amplifié est détecté à l'aide d'une électrophorèse sur gel d'agarose. En cas d'amplification réussie on obtient un fragment d'ADN de longueur définie, reconnaissable dans le gel sous forme d'une bande. En l'absence d'amplification cette bande n'apparaît pas. La Bande témoin est visible lorsque la réaction se passe dans les conditions optimales définies par le fabricant.

Pour procéder au typage, il est nécessaire d'abord d'extraire l'ADN des cellules.

2-10-2 EXTRACTION DE L'ADN

2-10-2-1 Le protocole d'extraction

L'ADN a été extrait à partir des cellules mononuclées périphériques en utilisant le kit d'extraction (GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit, Sigma).

L'extraction se déroule en trois étapes :

Première étape : la lyse cellulaire

Le culot leucocytaire après être décongelé à la température ambiante est resuspendu avec 200 µl de solution de resuspension en présence de la protéinase K puis vortexer. Ensuite 200 µl de solution de lyse C est ajoutée et incubée à 55°C pendant 10 min.

Deuxième étape : la précipitation de l'ADN

Dans la colonne qui est un système de filtre, 500µl de la solution de lavage est ajoutée puis centrifugée à 11400 rotations par minute (rpm) pendant 1 min. La solution filtrée est rejetée. Après incubation 200µl d'éthanol (95 -100°) est ajouté dans la solution homogénéisée et transférée dans la colonne déjà traitée puis centrifugée à plus de 8400 rpm pendant 1 min. Ensuite La colonne est placée dans un nouveau tube et laver deux fois avec 500 ul de solution de lavage.

Troisième étape : l'élution de l'ADN

Deux cent ul de la solution d'élution est ajoutée dans la colonne qui est lavée et placée dans un autre tube. Pour récupérer l'éluat contenant l'ADN, la solution est centrifugée à 9400 rpm pendant 1 min.

2-10-2-2 – La Spectrophotométrie

Elle permet de déterminer la concentration et la pureté de l'ADN extrait en déterminant l'absorbance (A) de l'ADN extrait à une longueur d'onde de 260/280 nm. Pour cette quantification nous avons utilisé un spectrophotomètre (BioPhotometer Eppendorf). Dans notre étude la concentration de l'ADN devait être comprise entre 25-200 ng/µl avec une absorbance comprise entre 1,65 – 1,80.

2-10-3 AMPLIFICATION PAR LA TECHNIQUE DE PCR AVEC LE KIT MICROPLAQUE SSP DE Onelambda

2-10-3-1 Matériels fournis

- Plaques de typage ADN micro SSP de 96 puits,
- Tubes de D-mix (mélange-mère) pré-aliquotés,
- Taq polymérase recombinante,
- Feuilles adhésives en nombre suffisant pour le test.

2-10-3-2 Matériels non fournis

- Pipettes (Gilson® P20 P200), Embouts jetables
- Vortex, Microcentrifugeuse
- Thermocycleur adapté au format des plaques 96 puits (PTC-200 Thermal cycler)
- TBE 1X, Agarose pure, Four à micro-onde, Deux peignes de 50 dents
- Cuve d'électrophorèse, Générateur pour cuve d'électrophorèse
- Transilluminateur UV, Appareil photographique ou système capteur d'image

2-10-3-3 La procédure

- Stériliser la chambre PCR à la lumière UV pendant 15 min.
- Ramener la plaque de PCR, le tube de D-mix, ainsi que l'échantillon d'ADN à la température ambiante.

Le mélange réactionnel utilisé était composé des éléments suivants :

- 1000 µl de D-mix
- 5,6 µl de Taq polymérase à la concentration de 5U/µl
- 111 µl d' ADN de concentration comprise entre 25-200ng/ µl

Dix µl de ce mélange réactionnel sont distribués dans chaque tube de la plaque, à l'exception du contrôle négatif. Afin d'éviter une contamination des amorces, faire attention à ce que l'extrémité de la pipette n'entre pas en contact avec les amorces. Pour cela le mélange est déposé sur la paroi du tube.

Remarque : le tube du contrôle négatif est composé de 9 µl du mélange réactionnel sans ADN et de 1µl d'eau stérile.

- Fermer hermétiquement les tubes de réaction de la plaque à l'aide d'une feuille adhésive.
- Placer la plaque dans le thermocycleur et débiter le programme ci-dessous

Température (°C)	Temps (sec)	Nombre de cycles
96	130	1
63	60	
96	10	9
63	60	
96	10	20
59	50	
72	30	
4	∞

2-10-4 LA PREPARATION DU GEL D'AGAROSE 2% :

Le gel était préparé comme suit : porter à ébullition 6 g d'agarose dans 300 ml de TBE 1X jusqu'à dissolution complète. Laisser refroidir la solution et ajouter 180ul de bromure d'éthidium. Verser ensuite la solution d'agarose sans faire de bulles d'air dans le support de gel préparé. Mettre des peignes pour créer des puits de 10µl et laisser reposer à la température ambiante jusqu'à la polymérisation.

2-10-5 L'ELECTROPHORESE DU GEL D'AGAROSE

Après la polymérisation de l'agarose, Le gel était placé dans la cuve d'électrophorèse contenant du TBE 1X. Les puits du gel doivent être complètement recouverts de tampon. Dans chaque puits, 10 µl du produit de PCR plus 1 µl de Dye (Bleu de Bromothymol) sont déposés. Un marqueur de poids moléculaire (Marqueur VI de Roche) est utilisé lors de l'électrophorèse afin de contrôler la taille des produits de PCR. L'électrophorèse se fait à 100 volts pendant 90 min.

Au terme de l'électrophorèse le gel est placé sur un transilluminateur UV et photographié afin d'interpréter les résultats.

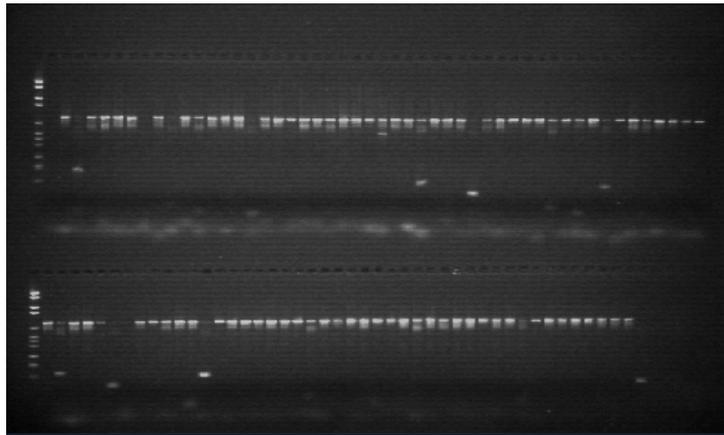
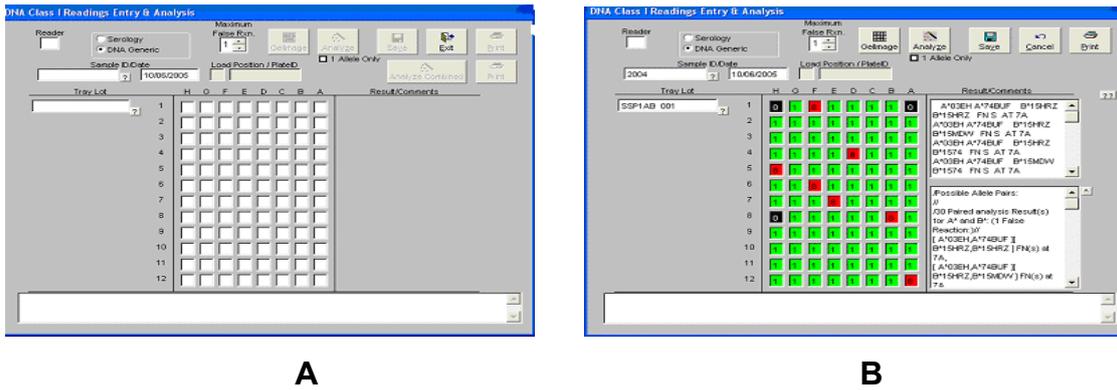


Figure 11 : Interprétation du gel

	Réaction positive	Réaction positive	Réaction négative	Pas d'amplification
Puits du gel				
Bande témoin	Absente			Absente
Bande spécifique			Absente	Absente

2-10-7 INTERPRETATION DES RESULTATS

Sur la photographie les produits apparaissent sous forme de bandes. Les bandes spécifiques sont exprimées en nombre de paires de bases en référence au marqueur utilisé pour l'électrophorèse. Les résultats sont interprétés à l'aide du logiciel HLA (One Lambda, INC : Dnalmt). Ce programme a permis de révéler l'allèle ou le groupe d'allèles correspondant.



A

B

Avant l'entrée des données

Après l'analyse des données

Figure 12 : image du logiciel DnaLmt

2-11. CONSIDERATIONS ETHIQUES :

Notre étude a été approuvée par le comité d'éthique de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'odontostomatologie de l'Université de Bamako (Lettre N°03014/FMPOS, voir Annexe). Les sujets d'étude étaient inclus après leur consentement libre et éclairé. Pour préserver leur anonymat, seul l'Investigateur principal gardait sous clé la fiche de consentement et les documents sources.

Un numéro d'anonymat sous forme de code était donné à chaque individu. Ce code était : Sérologie_N°_MB_Date (MB : Mali-Bamako).

RESULTATS

RESULTATS

Tableau IV : Distribution de la population d'étude selon la sérologie VIH

Sérologie	Effectif	Pourcentage (%)
VIH+	35	87,50
VIH-	5	12,50
Total	40	100

L'infection à VIH constituait 87,50% de notre population d'étude. Les donneurs VIH négatifs représentaient 12,50%.

Tableau V : Echantillons testés par ELISpot (classe I et classe II) et HLA (classe I)

		Testés	Non testés	Total
ELISPOT	Classe I	28	12	40
	Classe II	40	0	40
HLA		20	20	40

Sur 40 échantillons testés à l'ELISpot, 28 avaient été soumis aux peptides de la classe I et 40 aux peptides de la classe II. Les échantillons testés regroupaient les donneurs positifs et négatifs au VIH.

Tableau VI : Fréquence de la réponse à l'ELISpot classe I

Réponse Elispot classe I	VIH+		VIH-		Total	
	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%
Positive	3	11,11	0	0	3	10,71
Négative	24	88,89	1	100	25	89,29
Total	27	100	1	100	28	100

10,71% (3/28) des sujets stimulés avec peptides de la classe I, avaient répondu positivement. Sur les 27 sujets infectés par le VIH, 3/27 soit 11,11% avaient reconnu les peptides de classe I.

Tableau VII : Fréquence de la réponse à l'ELISpot classe II

Réponse Elispot classe II	VIH+		VIH-		Total	
	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%
Positive	16	45,71	2	40	18	45
Négative	19	54,29	3	60	22	55
Total	35	100	5	100	40	100

45% (18/40) des sujets testés pour la classe II avaient répondu positivement aux peptides. Sur les 35 sujets VIH+, 16 soit 45,71% avaient reconnu les peptides de classe II. Chez les 5 sujets non infectés par le VIH 40% ont donné une réponse.

Tableau VIII : Immunogénicité des épitopes de la classe I et classe II chez les patients VIH+

Epitopes	Classe I		Classe II		Total	
	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%
Positifs	4	40	18	90	22	73,33
Négatifs	6	60	2	10	8	26,67
Total	10	100	20	100	30	100

Parmi les épitopes qui avaient été utilisés, 40% induisaient une réponse immunitaire pour la classe I et 90 % pour la classe II.

Tableau IX: Fréquences alléliques HLA-A au cours de notre étude

Allèles	Effectifs	%
A*02	5	7.81
A*0220	1	1.56
A*0255	1	1.56
A*01TNB	1	1.56
A*0107	1	1.56
A*03	2	3.13
A*0308	1	1.56
A*0312	2	3.13
A*0310	1	1.56
A*03EH	1	1.56
A*11	3	4.69
A*1117	1	1.56
A*2301	5	7.81
A*2309	4	6.25
A*2414	1	1.56
A*2503	1	1.56
A*2607	1	1.56
A*30	6	9.38
A*3007	3	4.69
A*3008	2	3.13
A*32ZA	1	1.56
A*33FDX¹	5	7.81
A*34GM	1	1.56
A*3603	1	1.56
A*3601	2	3.13
A*6603	1	1.56
A*6819	1	1.56
A*68	3	4.69
A*68CD	1	1.56
A*7404	2	3.13
A*74BUF	1	1.56
A*7410	2	3.13
Total	64	100.00

Les fréquences alléliques HLA-A au sein de notre population d'étude étaient plus élevée avec les allèles A*30, A*2301, A*33FDX et A*02 avec des fréquences respectives de 9,38% et 7,81%.

¹ A*3301/03/04/05/06/07

Tableau X: Fréquences alléliques HLA-B au cours de notre étude

Allèles	Effectifs	%
B*07	1	1.92
B*0713	1	1.92
B*08	1	1.92
B*0814	1	1.92
B*08AEN	1	1.92
B*1517	1	1.92
B*1547	1	1.92
B*1574	2	3.85
B*15HRZ²	3	5.77
B*15MDW	2	3.85
B*18	2	3.85
B*1802	1	1.92
B*1815	2	3.85
B*1819	1	1.92
B*2705	1	1.92
B*35	1	1.92
B*3511	1	1.92
B*3521	1	1.92
B*3524	1	1.92
B*4032	1	1.92
B*40CVR	1	1.92
B*40SDX	1	1.92
B*41MY	1	1.92
B*4703	1	1.92
B*4702	1	1.92
B*5002	1	1.92
B*50AD	1	1.92
B*51	2	3.85
B*5102	1	1.92
B*5104	1	1.92
B*5124	3	5.77
B*5129	1	1.92
B*51RKF	1	1.92
B*5204	2	3.85
B*52AE	2	3.85
B*5302	1	1.92
B*5308	1	1.92
B*53JU	2	3.85
B*7804	1	1.92
B*78AB	1	1.92
Total	52	100.00

Les allèles B*5124 et B*15HRZ avaient les fréquences alléliques HLA-B les plus élevées avec 5,77%.

² B*1503, B*1561

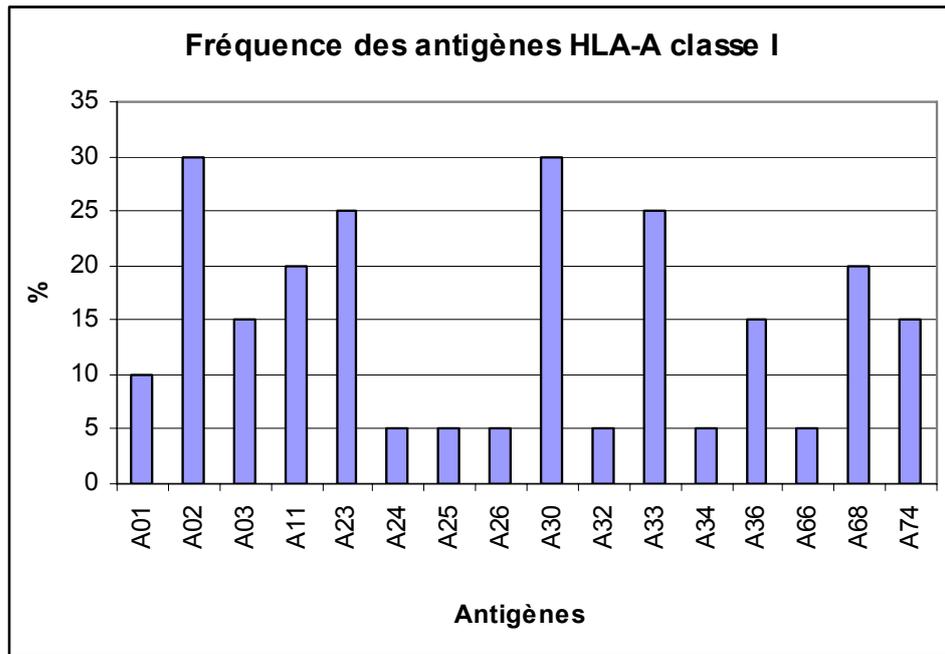


Figure 13 : Sur les 20 individus testés pour le typage HLA, Les antigènes les plus prévalents étaient A02, A30, A23, et A33. Seulement 15% présentaient l'antigène A03.

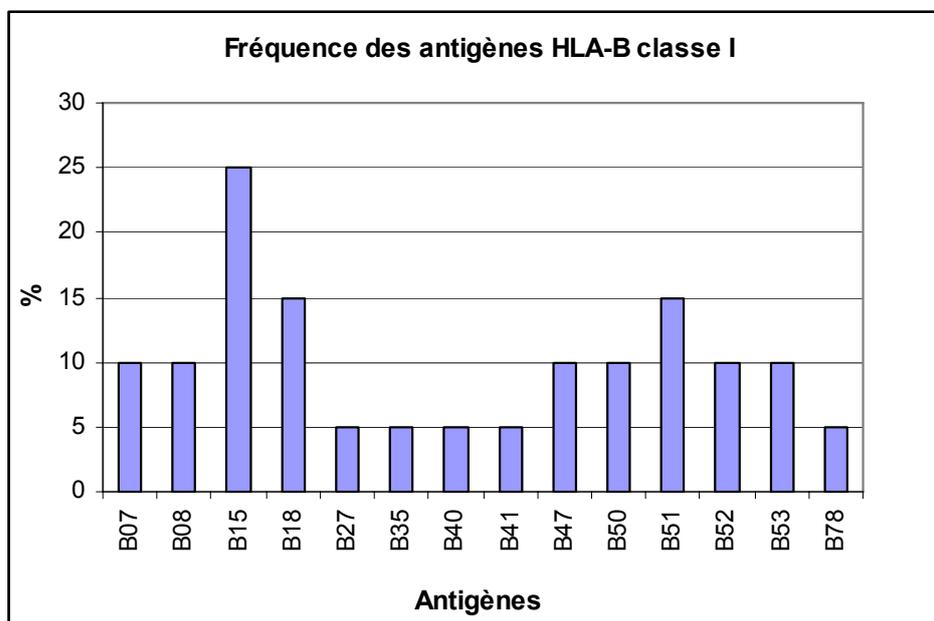


Figure 14 : Sur les 20 individus testés pour le typage HLA, les antigènes les plus prévalents étaient le B15, B18 et B51 avec respectivement 25% et 15% pour les deux derniers.

Tableau XI : Polymorphisme des antigènes du locus A

Antigènes	Nombre d'allèles	Fréquence (%)
A01 (A*0107, A*01TNB)	2	6,25
A02 (A*02, A*0220, A*0255)	3	9,38
A03 (A*03, A*0308, A*0310,A*0312,A*03EH)	5	15,62
A11 (A*11, A*1117)	2	6,25
A23 (A*2301, A*2309)	2	6,25
A24 (A*2414)	1	3,12
A25 (A*2503)	1	3,12
A26 (A*2607)	1	3,12
A30 (A*30, A*3007, A*3008)	3	9,38
A32 (A*32ZA)	1	3,12
A33 (A*33FDX)	1	3,12
A*34 (A34GM)	1	3,12
A36 (A*3601, A*3603)	2	6,25
A66 (A*6603)	1	3,12
A68 (A*68, A*6819, A*68CD)	3	9,38
A74 (A*7404, A*7410, A*74BUF)	3	9,38
Total	32	100

Au total 32 allèles du locus A avaient été identifiés parmi les 20 sujets testés. HLA-A03 présentait le plus grand nombre d'allèles (15,62%) dans la population d'étude. Il est suivi de HLA-A02, HLA-A30, HLA-A68, HLA-A74 avec 9,38%.

Tableau XII : Polymorphisme des antigènes du locus B

Antigènes	Nombre d'allèles	Fréquence (%)
B07 (B*07, B*0713)	2	5
B08 (B*08, B*0814, B*08AEN)	3	7,5
B15 (B*1517, B*1574, B*1547, B*15MDW, B*15HRZ)	5	12,5
B18 (B*18, B*1802, B*1815, B*1819)	4	10
B27 (B*2705)	1	2,5
B35 (B*35, B*3511, B*3521, B*3524)	4	10
B40 (B*4032, B*40CVR, B*40SDX)	3	7,5
B41 (B*41MY)	1	2,5
B47 (B*4702, B*4703)	2	5
B50 (B*5002, B*50AD)	2	5
B51 (B*51, B*5102, B*5104, B*5124, B*5129, B51RKF)	6	15
B52 (B*5204, B*52AE)	2	5
B53 (B*5302, B*5308, B*53JU)	3	7,5
B78 (B*7804, B*78AB)	2	5
Total	40	100

Au total 40 allèles du locus B avaient identifiés parmi les 20 sujets testés. HLA-B51 et HLA-B15 présentaient le plus grand nombre d'allèles avec respectivement 15% et 12,5%. Ils étaient suivis de HLA-B18 et HLA-B35 avec 10%.

Tableau XIII : relation des antigènes HLA-A avec la réponse à l'ELISpot des Classes I et II

Antigènes	Réponse à l'Elispot					
	Classe I		Classe II		Epitopes	
	+	-	+	-	Classe I	Classe II
A01	0	2	1	1	-	Pol1046
A02	0	3	1	5	-	Pol 1046
A03	0	2	0	4	-	-
A11	0	4	1	3	-	Pol 1047, 1049
A23	0	4	2	2	-	Gag 1043,1044
A24	0	1	0	1	-	-
A25	0	1	1	0	-	Pol 1047, 1049
A26	0	1	1	0	-	Pol 1047, 1049
A30	0	4	1	5	-	Gag 1043, 1044
A32	0	1	1	0	-	Pol 1047, 1049
A33	1	3	1	4	Pol 1077, Tat 1079	Gag 1043,1044, Pol 1046, 1051, 1047, 1049
A34	0	1	0	1	-	-
A36	1	2	2	1	Pol 1077, Tat 1079	Vpr 1053, Tat 1054, Env 1058, Pol 1046, 1051
A66	1	0	1	0	Pol 1077, Tat 1079	Pol 1046, 1051
A68	0	2	0	4	-	-
A74	0	2	2	1	-	Pol 1047, 1049, 1046

Les sujets qui avaient donné une réponse positive à l'Elispot (classe I et classe II) présentaient les antigènes A33, A36, A66. Les sujets ayant l'antigène A03 n'avaient pas donné de réponse à l'Elispot avec la classe I. les peptides Pol_1077 et Tat_1079 avaient le plus répondu après stimulation par les épitopes de classe I

Tableau XIV : relation des antigènes HLA-B avec la réponse à l'ELISpot des classes I et II

Antigènes	Réponse à l'Elispot					
	Classe I		Classe II		Epitopes	
	+	-	+	-	Classe I	Classe II
B07	0	1	0	2	-	-
B08	0	1	1	1	-	Gag 1043,1044
B15	0	1	1	4	-	Gag 1043, 1044
B18	0	2	1	2	-	Vpr 1053, Tat 1054, Env 1058
B27	0	1	0	1	-	-
B35	0	1	0	1	-	-
B40	0	1	0	1	-	-
B41	0	1	0	1	-	-
B47	0	2	1	1	-	-
B50	0	2	0	2	-	-
B51	0	3	2	1	-	Gag 1043, 1044, Vpr 1053, Tat 1054, env 1058
B52	0	2	0	2	-	-
B53	0	1	1	1	-	Gag 1043, 1044
B78	0	1	1	0	-	Vpr 1-53, Tat 1054, Env 1058

Aucune réponse positive avec la classe I n'avait été obtenue avec les sujets ayant l'antigène B dans leur haplotype.

Tableau XV : relation entre les allèles du locus A et la réponse à l'ELISpot

Allèles	Réponse classe I	Réponse classe II
<i>A*0107, A*01TNB</i>	–	Pol1046
<i>A*02, A*0220, A*0255</i>	–	Pol 1046
<i>A*03, A*0308, A*0310, A*0312, A*03EH</i>	–	–
<i>A*11, A*1117</i>	–	Pol 1047, 1049
<i>A*2301, A*2309</i>	–	Gag 1043, 1044
<i>A*2414</i>	–	–
<i>A*2503</i>	–	Pol 1047, 1049
<i>A*2607</i>	–	Pol 1047, 1049
<i>A*30, A*3007, A*3008</i>	–	Gag 1043, 1044
<i>A*32ZA</i>	–	Pol 1047, 1049
<i>A*33FDX</i>	Pol 1077, Tat 1079	Gag 1043, 1044, Pol 1046, 1051, 1047, 1049
<i>A34GM</i>	–	–
<i>A*3601, A*3603</i>	Pol 1077, Tat 1079	Vpr 1053, Tat 1054, Env 1058, Pol 1046, 1051
<i>A*6603</i>	Pol 1077, Tat 1079	Pol 1046, 1051
<i>A*68, A*6819, A*68CD</i>	–	–
<i>A*7404, A*7410, A*74BUF</i>	–	Pol 1047, 1049, 1046

Le test de chi carré montre qu'il n'y a pas de relation entre le nombre d'allèles des antigènes du locus A et la réponse à l'ELISpot (classe I : $\chi^2 = 0$ et $p = 0,99$ et classe II : $\chi^2 = 112,3$ et $p = 0,99$).

Tableau XVI : relation entre les allèles du locus B et la réponse à l'ELISpot

ALLELES	REPONSE CLASSE I	REPONSE CLASSE II
<i>B*07, B*0713</i>	–	–
<i>B*08, B*0814, B*08AEN</i>	–	Gag 1043,1044
<i>B*1517,B*1574,B*1547,B*15MDW,B*15HRZ</i>	–	Gag 1043, 1044
<i>B*18, B*1802, B*1815, B*1819</i>	–	Vpr 1053, Tat 1054, Env 1058
<i>B*2705</i>	–	–
<i>B*35, B*3511, B*3521, B*3524</i>	–	–
<i>B*4032, B*40CVR, B*40SDX</i>	–	–
<i>B*41MY</i>	–	–
<i>B*4702, B*4703</i>	–	–
<i>B*5002, B*50AD</i>	–	–
<i>B*51,B*5102,B*5104,B*5124,B*5129,B*51RKF</i>	–	Gag 1043, 1044, Vpr 1053, Tat
<i>B*5204, B*52AE</i>	–	–
<i>B*5302, B*5308, B*53JU</i>	–	Gag 1043, 1044
<i>B*7804, B*78AB</i>	–	Vpr 1-53, Tat 1054, Env 1058

Le test de chi carré montre qu'il n'y a pas de relation entre le nombre d'allèles des antigènes du locus B et la réponse à l'ELISpot (classe II : $X^2 = 41,18$ et $p = 0,99$).

DISCUSSION

Discussion

Nous avons conduit une étude à visée investigatrice pour évaluer la réponse des lymphocytes T des donneurs de sang volontaires aux épitopes obtenus des différentes protéines de VIH-1 et d'identifier les allèles de classe I du système HLA.

Les donneurs étaient recrutés au niveau du Centre National de Transfusion Sanguine (CNTS) à Bamako. En plus de l'évaluation de la réponse lymphocytaire, nous avons tenté de déterminer les génotypes du système HLA chez les donneurs dont les cellules T ont été testées par la technique de l'ELISpot. La mise au point d'un vaccin passe par la compréhension de la réponse immunitaire.

La réponse aux épitopes de classe I était de 10,71% (3/27). Les sujets ont peu répondu à la stimulation cellulaire. L'utilisation des épitopes doit tenir compte des allèles HLA identifiés dans la population d'étude. Aussi l'induction d'une bonne réponse cellulaire avec les épitopes de classe I doit tenir compte d'une forte affinité pour les molécules de classe I, d'une capacité à former un complexe stable avec ces molécules et enfin d'une capacité à induire une activité cytotoxique. En effet, selon une étude menée par DeGroot et al (94), lorsque les sujets possédaient l'allèle A3 la réponse aux épitopes A3 était meilleure.

Ainsi pour identifier les allèles HLA dans notre population d'étude nous avons opté pour la méthode moléculaire de PCR-SSP par rapport à la méthode sérologique avec formation anticorps – antigène puisque l'approche moléculaire est plus dynamique car révèle le polymorphisme au niveau nucléotidique.

Les inconvénients de la méthode immunologique (sérologique) sont une difficulté d'interprétation des résultats et une multitude des réactions croisées entre les allèles.

Nous avons travaillé sur 20 échantillons qui ont été auparavant testés par la technique de l'ELISpot (Dabita, 2004) (95). Le résultat des 20 autres échantillons n'était pas interprétable. Nous pensons que cela est dû au fait que

les prélèvements sont restés longtemps au réfrigérateur (4°C) avant l'extraction de l'ADN.

Quatre épitopes sur 10 de classe I testés à l'ELISpot ont été reconnus par les donneurs. Ces épitopes étaient conçus à partir des protéines TAT, POL et ENV de VIH-1.

Au niveau du locus A, nous avons obtenu 16 antigènes, A02 et HLA A30 étaient les plus fréquents avec 30% suivi de HLA A23 soit 25% (Figure 4). Ce résultat contraste avec celui obtenu par Kalidi (1988) qui a retrouvé que la fréquence des antigènes HLA A23, A28, A30 était élevée parmi les Noirs en Afrique de l'Ouest. Par contre nos résultats concordent avec ceux de l'étude menée au Botswana (Novistky et al, 2000) dans laquelle les HLA A02, A30, A23 étaient les plus prévalents.

Quant au locus B, HLA B15 était le plus fréquemment observé dans notre échantillon, il représentait 25% tandis que les moins fréquents étaient B27, B35, B40, B41 et B78 (figure 5). Notre résultat contraste avec ceux de Kalidi et de l'étude menée au Botswana (Novisky et al, 2000) dont les antigènes les plus prévalents étaient respectivement le B5 et le B68 au niveau du locus B.

Au total nous avons obtenu 32 allèles du locus A (tableau XI). Les plus prévalents étaient A*30, A*02, A*2301 et A*33FDX avec respectivement 9,38% et 7,81% pour les trois autres. Nous n'avons pas trouvé une réponse positive après stimulation avec les épitopes de classe I. Par contre avec A*33FDX, A*6603 et A*3601 nous avons obtenu une réponse après stimulation mais avec les épitopes de A3. L'explication serait que A3, A33, A36 et A66 partageraient le même déterminant antigénique qui permettrait la reconnaissance cellulaire.

Pour le locus B 39 allèles ont été retrouvés dont les plus représentatifs étaient le B*15HRZ et le B*5124 avec 5,76% (tableau XII). Nos résultats diffèrent de l'étude

menée par Cao et al dans laquelle les allèles les plus prévalents étaient A*2301, A*3001, B*5301, B*4201, B*3501. Cette différence pourrait être due à la taille de notre échantillon mais aussi à l'hétérogénéité de notre population urbaine.

Les sujets ayant dans leur haplotype le locus B n'ont pas donné de réponse positive à l'ELISpot, cela serait probablement dû au fait que les épitopes utilisés n'étaient pas de HLA-B.

Pour le polymorphisme des antigènes, nous avons évalué le nombre d'allèles pouvant être observé au niveau du système HLA. Ainsi A03 apparaît comme l'antigène le plus polymorphique et contient 5 allèles sur un total de 32 (tableau XII). Malgré ce polymorphisme élevé aucune réponse de classe I n'a été obtenue avec les épitopes. D'une manière statistiquement significative, nous n'avons pas retrouvé une association entre le nombre d'allèles et la libération de l'interféron gamma ($X^2 = 75,52$, $p = 0,98$ pour la classe I ; $X^2 = 478,38$ $p = 0,99$ pour la classe II).

Les épitopes de la classe I étaient pourtant conçus dans le contexte de HLA-A03 supertype regroupant le A*0301, A*1101, A*3101, A*3301 et A*6801. Une étude menée par Cara C et al (2003) montrait une probabilité de 59% si HLA-A03 supertype était utilisé. Le supertype regroupait les allèles A*0301, A*3101, A*3301, A*6801, A*7401, A*1101. Ainsi donc l'idéal serait peut être de concevoir des épitopes pluri-alléliques renfermant les allèles les plus prévalents dans notre population.

Ainsi, les réponses négatives obtenues avec les épitopes de classe I seraient dues à l'absence de formation du complexe peptide-CMH nécessaire à la présentation et à l'activation des cellules CD8+ cytotoxiques lymphocytaires. Nous avons la preuve que les cellules obtenues de nos sujets étaient suffisamment viables pour fournir une réponse appropriée à l'exposition aux épitopes car la plupart de nos sujets avaient répondu aux épitopes de classes II (45%).

CONCLUSION

RECOMMANDATIONS

CONCLUSION

Nous avons menée entre Août 2003 et octobre 2005 une étude prospective à visée investigatrice pour évaluer la réponse immunitaire et déterminer le polymorphisme du système HLA chez les donneurs de sang séropositifs au VIH-1. Au cours des études réalisées 53,33% des donneurs ont induit une réponse positive avec les épitopes de classe II et 10,71% avec les épitopes de classe I. Parmi les donneurs séropositifs stimulés avec les épitopes de classe I nous avons exploré leur système HLA. La distribution des allèles HLA de classe I montrait une prévalence élevée avec A*30, A*02, A*2301, A*33FDX pour HLA-A et B*15HRZ, B*5124 pour HLA-B.

Les antigènes les plus polymorphiques étaient le A03 (5 allèles) et B15 (5 allèles), B51 (6 allèles).

Le test statistique (chi carré) a montré qu'il y a pas de relation entre le nombre d'allèles observé et la réponse à l'induction de l'interféron- γ avec les épitopes de classe I.

En conclusion nous dirons que les épitopes de classe I n'ont pas été reconnus par nos sujets à cause du système HLA qui est très polymorphique dans notre population d'étude et que l'idéal serait de concevoir des épitopes multi - alléliques couvrant l'ensemble des antigènes HLA d'une communauté.

Au terme de notre étude nous faisons les recommandations suivantes :

- Mettre à la disposition du laboratoire les épitopes renfermant les différents allèles de classe I ;
- La réalisation du typage HLA avant la stimulation antigénique avec les épitopes de classe I ;
- Concevoir des épitopes renfermant les différents antigènes de notre population
- Continuer le typage HLA avec un échantillon plus exhaustif pour connaître la prévalence des antigènes HLA au Mali.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- **Girard PM, Katlama CH, Pialoux G.** SIDA, édition 1998 : Dion Paris. 3p 47p.
- 2- **OMS/ONUSIDA.** Le rapport sur l'épidémie de SIDA : Décembre 2005.Genève 2005. www.unaids.org
- 3- **OMS/ONUSIDA.** Le rapport sur l'épidémie de SIDA : Décembre 2004.Genève 2004. www.unaids.org
- 4- **Mohamed A, Issaka N, Flabou B.** Test de dépistage du VIH.In : cellule de planification et de statistique du ministère de la santé (CPS/MS), direction nationale de la statistique et de l'informatique (DNSI) et ORC Macro.2002. Claverton, Maryland, USA : CPS/MS, DNSI et ORC Macro. PP 279-287.
- 5- **Soureya Z.** Dépistage du VIH au centre national de transfusion sanguine de Bamako de 1993 à 1999. Thèse de Pharmacie,FMPOS,Bamako 2000, numéro 9
- 6- **Cao H, Kanki P, Sankale JL, Dieng-Sarr A et al.** Cytotoxic T-lymphocyte cross-reactivity among different human immunodeficiency virus type 1 clades: implications for vaccine development. J. virol 71 : 8615, 1997.
- 7- **Betts MR, Krowda J, Santamaria C, Balsamo et al.**
Cross-clade human immunodeficiency virus (HIV) specific cytotoxic T-lymphocyte responses in HIV infected Zambians. J. virol 71 :8908,1997.
- 8- **Pierre Auby :** Le SIDA tropical, actualités 2004.
www.medecine tropical.
- 8- **Marc Gentilini.** Médecine tropicale. Médecine-sciences. Flammarion Paris 1982

9- Marc R, Itoua-N'gaporo A. SIDA, infection à VIH : aspects en zone tropical. Ellipse Paris / AUPELF 336p.

10- Anonyme. Etude de la prévalence des maladies sexuellement transmissibles et de l'infection à VIH au Mali. Bamako, Août 1995.

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

12- Jean-Marie Huraux, Henri Agut, Jean-Claude Nicolas et al. Traité de virologie médicale, Estem 2003. 699p

13- Serge Kernbaum. Le praticien face au SIDA. Médecine-sciences. Flammarion Paris, 1996.

14- Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, et al. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor of the AIDS retrovirus. Nature.1984 ; 312 : 763-767

15- Smith B, Gartner S, Lieu Y, Perelson AS, et al. . Persistence of infectious HIV on follicular dendritic cells. J.Immunol. 1998 ; 166 : 690-696

16- Pomerantz RJ. Reservoirs of human immunodeficiency virus type1: the main obstacles to viral eradication. Clin. Infection. Dis.2002 ; 34 :91-97

17- Turner BG, Summer MF. Structural biology HIV. J Mol Biol 285 : 1-32

18- Brun-Vezinet F, Damond F et Simon F. Variabilité des virus de l'immunodéficience humaine de type1, journée SPE du 13 octobre 1999 à l'institut Pasteur à Paris : "génétique et maladies infectieuses dans l'environnement tropical".

19- Martine Peeters et Eric Delaporte. Génétique de VIH-1 : une inquiétante diversité. Journal de l'IRD, spécial SIDA en Afrique. www.ird.fr

20- Peeters M, Koumare B, Mounirou B, Bougoudogo F et al.
Genetic Subtypes of HIV type 1 and HIV type 2 strains commercial sex workers from Bamako, Mali. AIDS Res Hum RETROVIRUS 1998; 14: 51-8.

21- Montacon C, Touré-Kane C, NKengasong JN et al. CRF06-cpx : a new circulating recombinant form of HIV-1 in west Africa involving A, G, K, J. Journal of Acquired Immune deficiency Syndromes. 2002 Apr 15 ; 29(5) : 522-30.

22- Centers for Diseases Control, Task force on Sarcoma and Opportunistic infections. Epidemiologic aspects of the current outbreak of Kaposi's Sarcoma and opportunistic infections, N. Engl. J. Med. 1982 ; 306 : 246-252.

23- www.pathmicro-med.sc.edu

24- Fattoruso V / Rittee O. Vandemacum clinique du diagnostique au traitement. 16^{ème} édition, Edition Masson, 2001.

25- Centers for diseases control, Task Force on Kaposi's Sarcome and Opportunistic Infections. Epidemiologic aspects of the current outbreak of kaposi's sarcome and opportunistic infections, N. Engl. J. Med. 1982 ; 306 : 248-252

26- OMS. 2 meeting des centres collaborateurs de l'OMS sur le SIDA, Bull. OMS. 1986 ; 64 : 221-231

27- OMS. Syndrome d'immunodéficience acquise, SIDA révision 1987 de la définition CDC/OMS du cas de SIDA, Rel. Epidemio. Hebdo. 1988 ; 63 :1-8

28- Redfiel DRR, Wright DC, Tramont EC. The walter reed staging classification for HTLVIII/ LAV infection, N.Engl. J. MED 1986 ; 314 : 131-132.

29- Centers for Diseases Control. Classification for human T-lymphotropic virus type II/ lymphodenopathy-associated virus infections, Ann. Int. Med. 1986 ; 105 :234-237

30- Mc Cune JM. The dynamic of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. Nature. 2001; 410: 974-979.

31- Meygaard LE, Hoven Kamp, Keet IP, Hooibrink B et al. Single cell analysis of IL-4 and INF-gamma product by T-cell from HIV-infected individuals: decreased IFN-gamma in the presence of preserved IL-4 production. J. Immunul.1996 ; 157 :2712-2718.

32- Koopmen GH, Niphuis, Newman W, Maino VC et al. Decreased expression of IL-2 in control and effector CD4 memory cells during progression to AIDS in rhesus macaques. AIDS. 2001 ; 15 : 2359-2369.

33- Rosenberg ES, Billingslej JM, Caliendo AM, Boswell SL, et al. Vigorous HIV-1 specific CD4+ T-cell responses associated with control of viremia. Science. 1997 ; 278 : 1447-1450.

34- Carmickael A, Jin X, Sissons P, Borysiewiez L. Quantitative analysis of the human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) response at different stages of HIV-1 and infections : differential CTL responses to HIV-1 and Epstein-Barr virus in late disease. J. Exp. Med. 1993 ;177 :249-256.

35- Nixon DF, Appay V, Danakoe SM, Gillepsie GM, et al. HIV specific CD8+ T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J. Exp. Med.* 2000 ; 192 : 63-75.

36- Samre A, Hosmalin A, Dumaurier MJ, Dutoit Y, et al. HIV specific effector cytotoxic T lymphocytes and HIV producing cells colocalize in white pulps and germinal centres from infected patients. *Blood.*2001; 97: 6087-6095.

37- Dupuis M, Deschemin JC, Sicard D, Salmon D, et al. Broad intense anti-human immunodeficiency virus (HIV) ex-vivo CD8+ responses in HIV type-1 infected patients : comparison with anti-epstein-Barr virus responses and changes during antiretroviral therapt. *J. Virol.* 1999; 73:7108-7116.

38- Rowland-Jones S, Nixon DF, Phillips RE, Gotch FM, et al. Human immunodeficiency virus Genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature.*1991; 354:453-459.

39- Andrieu M, Chapsin D, Desoutter JF, Bouchaert I, et al. Downregulation of major hitocompatibility classI on human dentritic cells by HIV nef impairs antigen presentation to HIV-specific CD8+ T lymphocytes. 2001. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.*2001; 17:1365-1370.

40- Morisset R, Cohen EA, Xu J, Toma E, SubbRamanian RA, Menezes J, Ahmad A. Comparison of human immunodeficiency virus (HIV) specific infection enhancing and inhibiting antibodies in AIDS patients. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40: 2141-2146.

41- Fleury HJ, Pellegrin I, Kirn A, Moog C, and Aubertin AM. Autologous and heterologous neutrealizing antibody responses following initial seroconversion in

human immunodeficiency virus type-1 infected individuals. J. Virol. 1997; 72: 1403-1410.

42- Reitter J, Means RE, Desrosiers RC. A role for carbohydrates in immune evasion in AIDS. Nat. Med. 1998; 4: 679-684.

43- Montefiori DC, Graham BS, Kliks S, Wright PF. Serum antibodies to HIV-1 in recombinant vaccinia virus recipients boosted with purified recombinant gp160. NIAD AIDS vaccine clinical trials. Network. J. clin. Immunol. 1992; 12: 429-439.

44- Zagury JF, Still A, Blatter W, Lachgar A, et al. Antibodies to the HIV-1 Tat proteine correlated with non progression to AIDS: a rationale for the use of Tat toxoid as HIV-1 vaccine. J. Hum. Virol. 1998; 1 : 282-292.

45- Le VIH/SIDA au Mali. Evolution et impacts sur le développement. Ministère de la santé, policy project/ USAID, Bamako. Janvier 2002; 54p

46- Nicole Couprie. Typage HLA : réalisation et intérêt en pathologie rhumatologique. [Http://www.biospeonline.com](http://www.biospeonline.com)

47- Bensa JC. Le complexe majeur d'histocompatibilité et systèmes apparentés. Septembre 2004. <http://perso.wanado.fr>

48- Sita Naik. The human HLA system. J India Rheumatol Assoc 2003; 11:79-83

49- Claude Ronsin, Ivry Surseine. Le système HLA: intérêt en clinique. www.corata.org

50- Charron D : immunogénétique de la transplantation.

www.leucemie-espoir.org

51- François Lemonier. Apprêtage et présentation des antigènes dans le contexte CMH de classe I. <http://www.virologie.fr>

52- Claude Leclerc. La présentation de l'antigène aux cellules T. www.virologie.fr

53- Gilbert Semana, Erwann Quelvennec. Exploration du système HLA : pratiques et indications. www.sciencedirect.com

54- Anonyme. Proposed WHO criteria for interpreting results from western blot assay for HIV-1, HIV-2 and HTLV-I/ HTLV-II. Wkly Epidemio Rec. 1990 ; 65 : 281-288.

55- Barin F. Retrovireadae : les virus de l'immunodéficience humaine (VIH), virologie médicale. Collection Azay, A.Mamelle. Septembre 2002 ; 798 : 569-594.

56- Présentation de la PCR. www.ens-lyon.fr/pcrprincipe.htm

57- Wormser Gary P AIDS and others manifestations of HIV infection, second édition. Raven Press LTD, New York 1992. 75p

58- Gérard Antoine Denoyel. 2000. Diagnostique et suivi de l'infection à VIH. [Http://www.biospeonline.com](http://www.biospeonline.com)

59- SIDA. Maladies à déclaration obligatoire. www.spc.org.nc

60- Ward D : comprendre le VIH/SIDA. Le guide de la fondation américaine pour la recherche sur le SIDA (Am FAR) 2003.

61- Sabin AB. Improbabilité of effective vaccination against human immunodeficiency virus because of its intracellular transmission and rectal portal of entry. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992; 89: 8852-8855.

62- Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, et al. Control of viremia in semian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. Science. 1999 ; 283: 857-860.

63- Girard PM, Katlama CH, Pialoux G. VIH, 6 édition: Dion Paris 2004. 635p.

64- Letvin NL. Strategies for an HIV vaccine. J. Clin. Invest. 2002; 110:15-20.

65- Brettler DB, Greenough TC, Samasundaran M, Panicali DL, Sullivan JL. Human immunodeficiency virus type-1 specific cytotoxic T lymphocytes (CTL), virus load and CD4 T cell loss: evidence supporting a protective role for CTL in vivo. J. Infect. Dis. 1997; 176: 118-125.

66- Kallams SA, Buchbinder SP, Rosenberg ES, Billingsley JM, et al. Association between virus specific cytotoxic T-lymphocyte and helper responses in human immunodeficiency virus type-1 infection. J. Virol.1999; 73: 6715-6720

67- Fouts TR, Tuskan RG, Chada S, et al. Construction and immunogenicity of salmonella thyphimurin vaccine vectors that express HIV-1 gp120. Vaccine.1995; 13:1697-1705.

68- Shata MT, Stevceva L, Ag Wale S, et al. Recent advance with recombinant bacterial vaccine vectors. Mol Med. 200; 6:66-71.

69- Lagranderie M, Winter N, Balazuc AM, Gicquel B, Gheorghiu M. A cocktail of mycobacterium bovis BCG recombinant expressing the SIV nef. Env and Gag antigens induces antibody and cytotoxic responses in mice vaccinated by different mucosal routes. *AIDS Res. HUM. Retrovirus.* 1998; 14: 1625-1633.

70- Aldovini A, Young R, Jarvis Ma, Leung NJ, et al. The kinetics of specific immune responses in rhesus monkeys inoculated with live recombinant BCG expressing SIV Gag, Pol, Env and Nef proteins. *Virology.* 2000; 268: 94-103.

71- Rayevskaya MV and Frankel FR. Systemic immunity and mucosal immunity are induced against human immunodeficiency virus Gag protein in mice by a new hyperattenuated strain of *Listeria monocytogenes*. *J. Virol.* 2001; 75: 2786-2791.

72- Caley IJ, Betts MR, Irlbeck DM, Davis NL et al. Humoral, mucosal and cellular immunity in response to a human immunodeficiency virus type-1 immunogen expressed by a Venezuelan equine encephalitis virus vaccine vector. 1997; 71: 3031-3038.

73- Ourmanov I, Biliska M, Hirsch VM, Montefiori DC. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing the surface gp120 of simian immunodeficiency virus (SIV) primers for a rapid neutralising antibody response to the SIV infection in macaques. *J. Virol.* 2000.74 :2960-2965.

74- Seth A, Ourmanov I, Schmitz JE, et al. Immunization with a modified vaccinia virus expressing simian immunodeficiency virus (SIV) gag-pol primers for an anamnestic gag specific cytotoxic T-lymphocyte response and its association with reduction of viremia after SIV challenge. *J. Virol.* 2000. 74 : 2502-2509.

75- Schmitz JE, Kuroda MJ, Lifton MA, Santra, et al. Recombinant canarypox vaccine elicited CTL specific for dominant and subdominant simian immunodeficiency virus epitopes in rhesus monkeys. *J. Immunol.* 2002; 168: 1847-1853.

76- Crotty S, Miller CJ, Lohman BL, et al. Protection against simian immunodeficiency virus vaginal challenge by using Sabin poliovirus vectors. *J. Virol.* 2001. 74: 7435-7452.

77- Luckay A, Nixon DF, Moretto J, Montefiori D, et al. An effective AIDS vaccine based on live attenuated vesicular stomatitis virus recombinants. *Cell.* 2001; 106: 539-549.

78- Hamajima K, Kawamoto S, Bukawa H, et al. Induction of potent humoral and cell-mediated immune responses following direct injection of DNA encoding the HIV type-1 Env and Rev gene products. *AIDS Res. Hum. Retrovirus.* 1995; 11: 933-943.

79- Bratt G, Nordlund S, Hinkula J, et al. Cellular cytotoxic response induced by DNA vaccination in HIV-1 infected patients. *Lancet.* 1998; 351: 1320-1325.

80- Check E. Second cancer case halts gene-therapy trials. *Nature.* 2003 ; 421 : 305.

81- Fisher E, Guillet JG, Kazatchkine M, et al. La recherche vaccinale contre le VIH à l'ANRS : édition Epilope Paris 2003.

82- Lai MZ, Briner TJ, Guillet JG, Smith JA, Gefter ML. Interaction of peptide antigens and class II major histocompatibility complex antigens. *Nature.* 1986; 324:260-262.

83- Dergy MA, Ahlers JD, Kelsall BL, et al. Mucosal immunization with HIV-1 peptide vaccine induces mucosal and systemic cytotoxic T lymphocytes and protective immunity in mice against intrarectal recombinant HIV-vaccinia challenge. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95: 1709-1714.

84- Chitta S, Hossain MM, Bernacky BJ, et al. Protection against chronic infection and AIDS by an HIV envelope peptide-cocktail vaccine in a pathogenic SHIV-rhesus model. *Vaccine.* 2001; 20:813-825.

85- Snow Bill. HIV vaccine handbook community perspectives on participating in research, advocacy and progress. Washington DC. AIDS vaccine advocacy coalition. 1999.

86- Martinon F, Gras-Masse H, Boutillon C, et al. Immunization of mice with lipopeptide bypasses the prerequisite for adjuvant. Immune response of BALB/c mice to human immunodeficiency virus envelope glycoprotein. *J. Immunol.* 1992; 149: 3416-3422.

87- Gahery-Segard H, Texier C, Figueiredo S, et al. Characterization of broadly cross-reactive HLA-DR restricted peptides in the Nef protein of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) upon lipopeptide vaccination. *Sous presse.* 2003

88- Gahery- Segard H, Sermet S, Poncelet H, et al. Lipopeptides induce cell-mediated anti-VIH immune responses in seronegative volunteers. *AIDS.* 2001; 15: 1239-1249.

89- Johnson RP, Kalamis K. The science of the HIV vaccine development. HIV insite knowledge base chapter. May 1998. 22p.

90- Montefiori DC, Goldstein S, Hamm TE, et al. Inactivated whole-virus vaccine derived from a proviral DNA clone of simian immunodeficiency virus induces high levels of neutralising antibodies and confers protection against heterologous challenge. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 199; 89: 2175-2179.

91- Theodore F, Aubertin AM, Darmont D, et al. Specific and non specific immunity and protection of macaques against SIV infection. *Vaccine.* 1992; 10:873-879.

92- Cranage M, Aubertin AM, Putkonen P, et al. Whole inactivated SIV vaccine grown on human cells fails to protect against homologous SIV grown on simian cells. *J. Med. Primatol.* 1993; 22: 100-103.

93- The GAIA AIDS vaccine Project/Bamako, Mali.

www.GAIAvaccine.org

94- Degroot AS, Jesdale B, Martin W, et al. Mapping cross-clade HIV-1 vaccine epitopes using a bioinformatics approach.

www.sciencedirect.com

95- Dabito D. Etude des épitopes-T immunogènes pour la mise au point d'un vaccin anti-VIH-1. Thèse de Pharmacie, FMPOS, Bamako 2004.

ANNEXES

Universite de Bamako (Bamako, Mali) Brown University (Providence, Rhode Island, USA)

Formulaire de Consentement Eclairé de Volontaire pour participer à un Programme de Recherche

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

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

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

Noms et Adresses des investigateurs

Ousmane KOITA, PharmD, PhD

Téléphone :221 79 25 ; 222 52 77 ; 674 93 12 ; Email : oakoita@ml. refer.org

Anatole TOUNKARA, MD, PhD

Téléphone : 221 66 08 ? 227 22 68, 2777 888 ; Email : cnts-bko@cefib.com

Soukalo Dao, MD

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

Souleymane Diallo, MD

Téléphone: 222 50 03, 671 00 79; Email: solo@experco.com

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

Votre participation est entièrement volontaire. Tous les renseignements recueillis seront tenus confidentiels et ne seront connus que des investigateurs. Les fiches individuelles seront mises dans une armoire fermée à clef et sous la responsabilité du Professeur Anatole Tounkara. Vous avez le droit de faire lire ce formulaire expliquant les procédures auxquelles vous serez soumis dans cette recherche. Vous avez le droit de poser toutes les questions relatives à cette étude aux différents investigateurs. Après, si vous décidez de participer à l'étude, veuillez s'il vous plait signer et dater ce formulaire devant la personne qui vous a expliqué l'étude. Vous aurez une copie de ce formulaire que vous pouvez garder.

1. Nature et but de l'étude

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

Ce projet a deux buts :

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

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

2. Explication des Procédures

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

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

3. Risques et Malaises

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

- Des légers maux de tête,
- Du gonflement du point de piqûre,
- Des échymoses, du saignement ou de l'infection du même point de piqûre,
- Un évanouissement

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

4. Bénéfices

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

5. Alternatives

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

6. Confidentialité

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

7. Utilisation future de vos échantillons

Nous allons avec votre accord conserver une partie des échantillons que nous allons collecter au cas où il y aurait des analyses additionnelles à faire dans le futur. Les échantillons seront conservés dans des congélateurs à Bamako et à Providence (Rhode Island, USA). Ces échantillons sont utilisés pour tester la réponse immunitaire des peptides et de déterminer des séquences de souche de VIH. Vous avez le droit de demander à ce que vos échantillons ne soient pas conservés ou soient détruits à tout moment.

8. Le traitement médical et le paiement en cas de blessure

Nous ne nous attendons à aucun risque inhabituel lié à cette étude. Cependant, si une blessure non prévue se produit comme résultat de votre participation dans cette étude, l'équipe de recherche se chargera de soigner votre blessure sans vous demander de payer. Par contre, les investigateurs ne vous donneront pas de l'argent pour l'incident. Si vous signez cet accord ceci ne va pas réduire vos droits légaux.

9. Le droit de se plaindre

S'il vous arrivait une occasion de plainte au cours de cette étude ou si vous désirez d'autres informations en ce qui concerne les règles des études de recherche ou des droits des gens qui participent à ces études, vous pouvez contacter le secrétariat du Comité d'éthique de la recherche sur l'être humain à la Faculté de Médecine à ce numéro de téléphone : (223) 222 53 77.

10. Signature (Participation)

JE RECONNAIS AVOIR LU LES EXPLICATIONS CI-DESSUS A PROPOS DE CETTE ETUDE , QUE TOUTES LES QUESTIONS ONT ETE REPONDUES AVEC SATISFACTION ET JE DONNE MON ACCORD POUR PARTICIPER A CETTE .

Signature du volontaire / autorisations représentatives

Date

JE RECONNAIS LE PROCESSUS ET/OU LA SIGNATURE DONN2E CI-DESSUS

Signature du témoin (requis si le formulaire est présenté)

Date

11. Signature (Utilisation future) des échantillons

JE RECONNAIS AVOIR LU LES EXPLICATIONS CI-DESSUS A PROPOS DE CETTE ETUDE, QUE TOUTES MES QUESTIONS ONT ETE REPONDUES AVEC SATISFACTION ET JE DONNE MON ACCORD POUR L'UTILISATION FUTURE DE MES ECHANTILLONS.

Signature du volontaire / autorisations représentatives

Date

JE RECONNAIS LE PROCESSUS ET/OU LA SIGNATURE DONNEE CI-DESSUS

Signature du témoin (requis si le formulaire est présenté)

Date

12. Signature de la personne expliquant le consentement

JE RECONNAIS AVOIR EXPLIQUE LE PROTOCOLE DE L'ETUDE PORTANT SUR LA VALIDATION DES EPITOPES DU VIH ET AVOIR REPONDU AUX QUESTIONS DU PARTICIPANT.

Signature de la personne expliquant le consentement

Date

FICHE SIGNALÉTIQUE

FICHE SIGNALÉTIQUE

Nom : SEYDOU GAOH

Prénom : Hadiza

Titre : VARIABILITE GENETIQUE DU SYSTEME HLA APRES STIMULATION PAR LES EPITOPES DU VIH-1.

Année académique : 2005 – 2006

Ville de soutenance : Bamako

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la faculté de médecine, de pharmacie et d'odonto-stomatologie (FMPOS)

Secteur d'intérêt : recherche vaccinale

Résumé : Au cours des 15 dernières années plusieurs études ont montré le rôle important joué par les lymphocytes T CD8+ (CTL) dans le contrôle de la réplication du VIH-1. Actuellement la recherche s'oriente vers un vaccin basé sur l'induction exclusive d'une immunité cellulaire. Mais les obstacles majeurs à cette recherche sont la grande variabilité du VIH-1 circulant dans le monde et le grand polymorphisme du système HLA. Les séquences des épitopes identifiés pour l'induction d'une réponse immunitaire dépendent strictement des antigènes de HLA présents à la surface des cellules de l'immunité.

L'étude que nous avons menée était de type prospective à visée investigatrice d'août 2003 à octobre 2005 pour évaluer la production d'interféron- γ après stimulation par les épitopes de classe I et classe II du VIH-1 et par la suite de déterminer le polymorphisme du système HLA des donneurs de sang séropositifs. La faible induction de la production de l'interféron- γ par les épitopes de classe I nous a poussé à limiter notre investigation à la classe I du VIH.

Notre échantillon était constitué de 40 donneurs bénévoles dont 35 donneurs séropositifs au VIH-1 et 5 donneurs séronégatifs au VIH-1. Parmi les 40 donneurs 28 ont été stimulés avec les épitopes de classe I et 20 ont été soumis au typage HLA. Nous avons observé une prévalence élevée des allèles A*30

(9,38%), A*02 (7,810), A*2301 (7,81), B*15HRZ (5,77), B*5124 (5,77). A02, A30, A23, A33, B15, A03, le B51 et le B15 étaient les antigènes les plus prévalents avec A03, B51 et B15 les plus polymorphiques.

Mots clés : VIH-1, Interféron- γ , HLA

CARD-INDEX SIGNALÉTIQUE

NAME: SEYDOU GAOH

First name: Hadiza

TITLE: GENETIC VARIABILITY OF HLA SYSTEM IN RESPONSE TO THE HIV-1 EPITOPES.

Town of defence: Bamako

Point of discharge: Library of the Faculty of Medicine, Pharmacy and Odontostomatologie (FMPOS)

Sector of interest: Vaccine research

Abstract: During the last 15 years several studies had shown the important part played by the lymphocytes T CD8+ (CTL) in the control of HIV-1's replication. Currently research is directed toward a vaccine based on the cellular's exclusive capability of induction of immunity. But the major obstacles for this research are the variability of the HIV-1 circulating in the world and the polymorphism of the HLA system. The HIV epitopes responsible for the immune response depend strictly on the HLA antigens present on immune cell's surface. We carried out a prospective study from August 2003 to October 2005 to evaluate the production of interferon- γ due to the HIV-1 epitopes class I and class II stimulation and to determine the polymorphism of the HLA system of HIV positive donors at the medical center of Bamako, Mali.

Due to a weak response of Interferon- γ to the HIV epitopes class I (10.71%) we limited our investigation to that class. Our sample consisted of 40 voluntary donors, which included 35 HIV-1 positives and 5 HIV-1 negatives. Among 40 subjects 28 were stimulated with the HIV epitopes class I and 20 were subjected to the HLA typing. We observed a high prevalence of the alleles A*30 (9, 38%), A*02 (7, 810), A*2301 (7, 81), B*15HRZ (5, 77), B*5124 (5, 77).

A02, A30, A23, A33, B15, A03, B51 and B15 were the antigens more prevalent with polymorphic A03, B51 and B15.

Key words: HIV-1, Interferon- γ , HLA

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 méprisée de mes confrères si j'y manque.

Je le jure !