

## 1. Historique

Le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) a été décrit pour la première fois en 1981, chez des homosexuels américains devant un tableau clinique inhabituel ; il est caractérisé par une altération profonde du système immunitaire, dont la conséquence est la survenue d'affections opportunistes.

L'infection, par les rétrovirus humains à tropisme lymphocytaire T initialement connus sous le nom de humain T cell leukaemia virus (HTLV I), était connue pour son association avec les leucémies à cellules T qui sévissait de façon endémique au Japon et aux Caraïbes. Un second virus HTLV II a été isolé chez un unique patient leucémique. Ces deux virus ont un tropisme marqué pour les lymphocytes T-CD4+ et peuvent les activer in vitro.

En 1983, l'équipe du professeur Montagnier de l'institut Pasteur de Paris travaillant sur des cellules de lymphocytes d'un patient atteint de lymphadénopathie généralisée persistante identifiait un virus qu'elle dénommait *lymphadenopathy associated virus* (LAV).

En 1984 aux Etats unis, l'équipe du professeur Gallo identifiait un virus analogue qu'elle baptisait respectivement HTLV III et ARV (Aids related virus), [71]. Toutes ces équipes avaient mis en évidence le même virus.

En 1985, des réactions sérologiques atypiques étaient notées sur des sérums de prostituées du Sénégal [4]. Ceci prouverait l'existence d'un virus humain proche du rétrovirus simien qui a été isolé en 1986 et désigné LAV-2.

En 1986 une révision de la nomenclature harmonisa les différentes dénominations et définit les VIH ou HIV (Human Immunodeficiency Virus) de type 1 et de type 2 comme agents causals de la maladie du SIDA.

## 2. Virologie

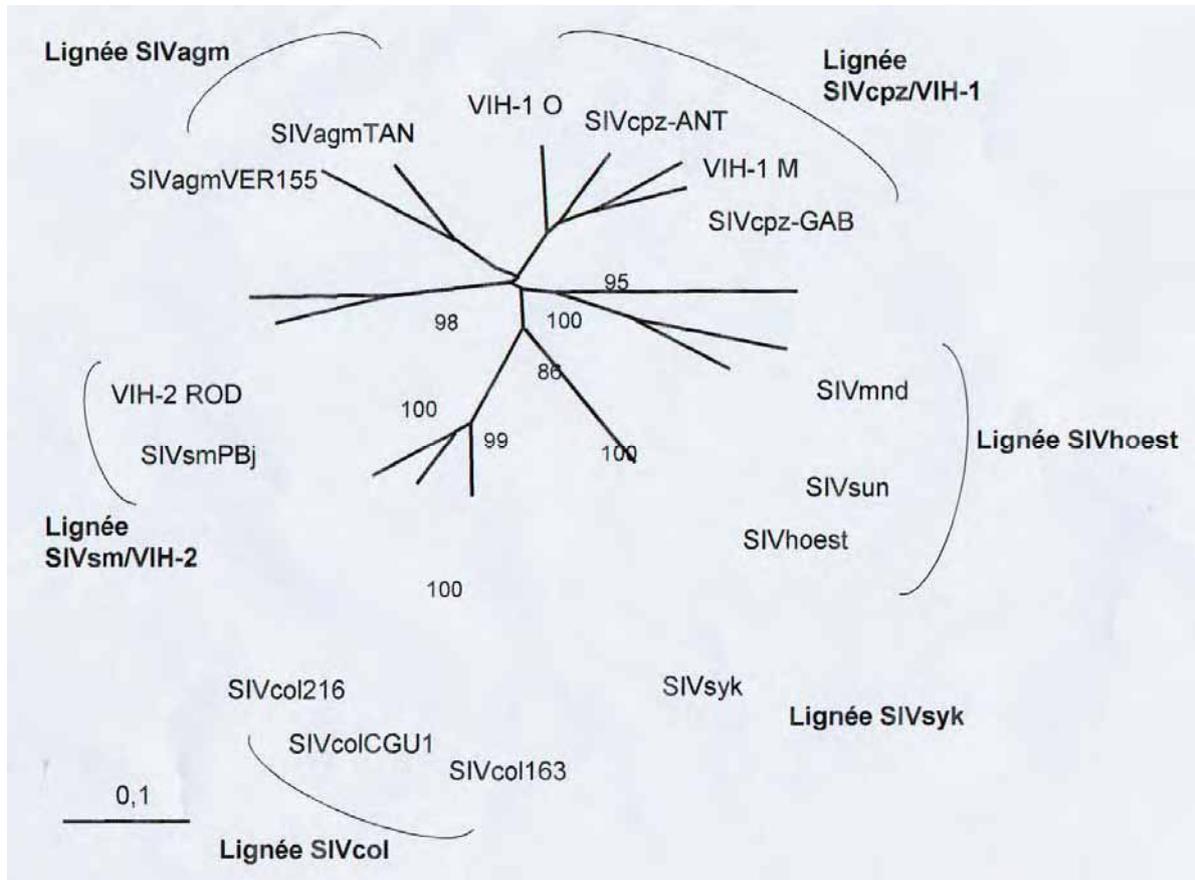
### 2.1. Taxonomie des VIH

Les virus responsables du SIDA appartiennent à la famille des **Retroviridae**, regroupant les virus à ARN possédant une transcriptase inverse ou RT (Reverse Transcriptase) capable de transcrire l'ARN viral en ADN bicaténaire proviral. Cette famille est subdivisée en trois sous-familles ; les **Oncovirinae**, les **Spumavirinae** et les **Lentivirinae** au sein des quelles on retrouve les lentivirus des primates dont les VIH et les Virus de l'Immunodéficience Simienne (SIV).

De nombreux primates africains sont infectés par les virus de l'immunodéficience simienne et les deux types de virus infectant les humains, VIH-1 et VIH-2, représentant une transmission zoonotique provenant de deux sources, à savoir le chimpanzé (*Pan troglodytes*) et le sooty mangabey (*Cercocebus atys*)

Les SIV identifiés à ce jour ne sont pas pathogènes pour l'hôte, mais le passage d'un SIV d'une espèce donnée à une autre peut le rendre virulent (cas des singes macaques infectés en captivité par les singes sooty mangabey).

Les analyses phylogénétiques ont montré les liens génétiques entre les lentivirus des primates non humains et les VIH et a permis d'identifier six lignées dont deux associent des espèces humaines et simiennes [16]; la lignée 1 regroupe le VIH-1 et le SIV du chimpanzé (SIVcpz), la lignée 2 comprend le VIH-2 et les SIVs (SIV mac et SIV sm) retrouvés chez le macaque et le sooty mangabey. Les lignées 3, 4, 5, 6 contiennent respectivement les virus SIV isolés chez les espèces de singes suivants : singes verts (SIVagm) mandrill (SIV mnb) groupés avec des singes lhoest et des singes sun-tailed (SIVsun), les singes sykes (SIV syk) enfin les singes colobes (*Colobus guereza*) (SIVcol).

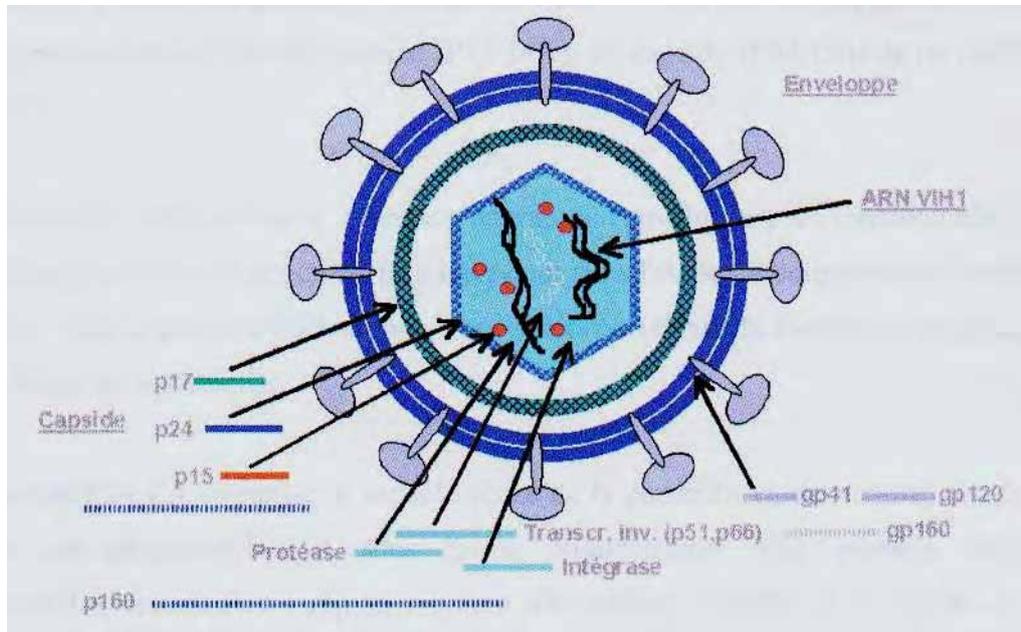


**Figure 1 : Arbre phylogénétique montrant les liens entre les différents Lentivirus de primates non humains et les VIH [16].**

## 2.2. Structure du virion de type I

Les VIH sont des virus enveloppés de 80 à 120 nm, possédant une nucléocapside dense excentrée en forme de trapèze. Cette capsidie contient le génome du virus (deux copies identiques d'ARN simples brins de polarité positive de 9,2 kilo base) et des protéines virales (transcriptase inverse, protéase, intégrase). La face interne de l'enveloppe est tapissée de protéines matricielles. Cette enveloppe qui est constituée par une bicouche lipidique

acquise lors du bourgeonnement des virions à la membrane des cellules infectées, porte des glycoprotéines d'origine virale.



**Figure N°2 : Structure de la particule du VIH-1 [90]**

### 2.3. Organisation génomique

La structure du génome viral est semblable pour tous les VIH avec une variation de la longueur d'une souche à une autre.

L'ARN est flanqué de séquences non codantes contenant de nombreux sites potentiels de liaison à des protéines cellulaires ; les LTR, pour *Long Terminal Repeat*. Neuf cadres de lectures ouverts sont présents sur ce génome, chacun correspond à un gène.

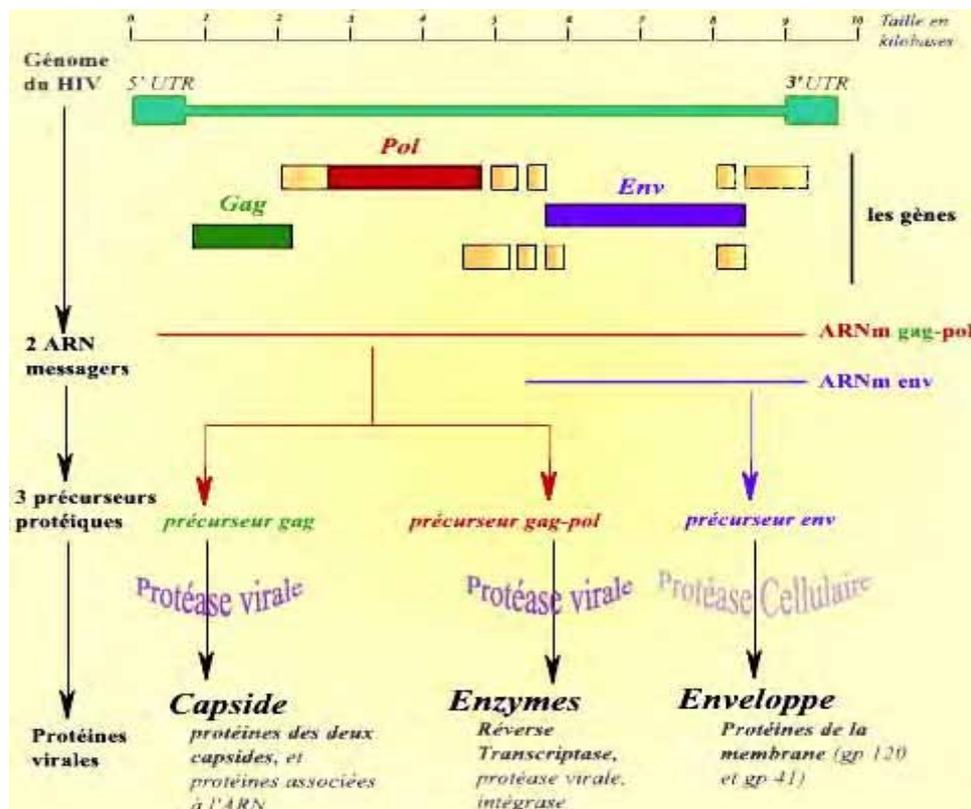
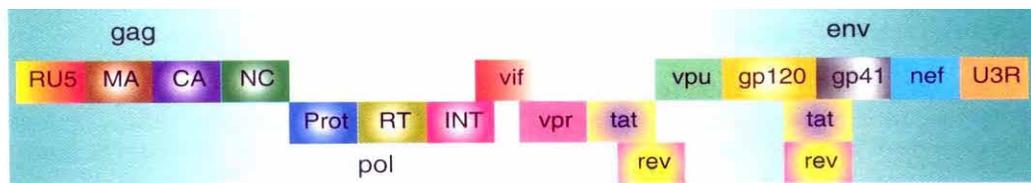


Figure N°3 : Organisation du génome des VIH-1 [90]

### 2.3.1. Gènes et protéines de structure du VIH-1

#### 2.3.1.1. Le gène *gag*

C'est le gène de l'antigène de groupe qui code pour la synthèse des protéines internes du virus. Il produit un précurseur qui est la P55 gag clivé par la protéase en protéine de matrice (P17MA), de capsid (P24CA) et en nucléoprotéine (P15NC).

La protéine P17MA est fixée sur la face interne de l'enveloppe par l'intermédiaire d'un acide myristique. Elle intervient dans l'étape de bourgeonnement du virion.

La protéine P24CA est phosphorylée et rentre dans la composition de la capsid. Deux régions fonctionnelles se retrouvent sur cette protéine ; la région majeure d'homologie (MHR) intervient avec l'extrémité C-terminal dans la formation des oligomères P24CA, aboutissant à l'assemblage de la particule virale, l'extrémité N-terminal participe à la morphogénèse de la capsid.

La protéine P15NC est un précurseur des protéines P7 et P9. La P7 intervient pour l'assemblage de l'ARN et la stabilité des particules virales.

#### 2.3.1.2. Le gène *pol* (polymérase)

Le gène *pol* code pour les enzymes virales de la capsid. Il produit un précurseur ; la protéine de fusion Pr160 clivée en **protéase** (P11pr) en **transcriptase inverse** (P51/66RT), et **intégrase** (P32IN).

**La protéase** assure le clivage des précurseurs Pr55 gag et Pr160gag/pol et intervient dans le rélargage des virions.

**La transcriptase inverse** est une ADN/ARN dépendante assurant la retro transcription de l'ARN viral en ADN proviral dans le génome de la cellule hôte.

**L'intégrase**, intègre l'ADN proviral dans le génome de la cellule.

### **2.3.1.3. Le gène *env* (enveloppe)**

Le gène *env* code pour les glycoprotéines d'enveloppe de surface, la gp120 SU, et transmembranaire gp41, sous la forme d'un précurseur gp 160 clivée par une protéase cellulaire.

#### **2.3.1.3.1. La glycoprotéine transmembranaire gp 41**

La gp 41 est une protéine constituée de trois domaines ; un domaine N-terminal, un domaine transmembranaire et le dernier intra cytoplasmique C-terminal, qui stabilise la structure virale en interaction avec la protéine p17 MA. Cette protéine est liée aux deux extrémités terminales de la gp 120 par des liaisons non covalentes. Le changement de conformation du complexe gp41/gp120 induit par l'interaction de la gp 120 avec les récepteurs cellulaires, entraîne la pénétration de l'extrémité N-terminale dans la membrane plasmique de la cellule.

#### **2.3.1.3.2. La glycoprotéine de surface gp 120 SU**

L'entrée du virus dans la cellule hôte nécessite la présence de la gp 120 SU. Elle agit avec deux récepteurs cellulaires, à savoir la glycoprotéine CD-4 et les récepteurs des chimiokines.

La structure génique de la gp 120 est caractérisée par une succession de cinq régions conservées et variables (C1 à C5 et V1 à V5).

### 2.3.2. Gènes et protéines de régulation

Le génome du VIH-1 comporte en outre d'autres gènes supplémentaires appelés gènes accessoires : *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *nef*, et *vpu*.

Le gène *vif* (virion infectivity factor) code pour une protéine de 23 kilodaltons qui augmente l'infectiosité du virus.

Le gène *vpr* (viral protein R) code pour une protéine de 14KD, elle intervient dans le transport de l'ADN proviral vers le noyau.

Le gène *tat* (transactivator of transcription) code pour une protéine de 14 KD, elle stimule et accroît la transcription des ARNs messagers de toutes les protéines virales.

Le gène *rev* (regulator of expression virion proteins) code pour une phosphoprotéine de 19KD, localisée dans le noyau des cellules. Elle permet la stabilisation des ARNm des gènes de structure et leur transport dans le cytoplasme pour la traduction.

Le gène *nef* (negative expression factor) code pour une protéine polymorphe ; deux non myristylées de 24 et 27KD, et une forme myristylée de 27KD. Elle est responsable de la diminution de l'expression des récepteurs CD4 à la surface des cellules infectées. Le gène *nef* serait essentiel pour une prolifération virale efficace et une progression vers la maladie.

Le gène *vpu* (viral protein U) est spécifique du VIH-1 ; il code pour une protéine de 126 KD. La protéine Vpu entraîne la dégradation des molécules CD4 dans le réticulum endoplasmique. Elle favorise le bourgeonnement et le relargage des virions produits dans les cellules infectées

### 2.3.3. Les LTRs

Elles sont formées de trois domaines U5, R et U3. Ces domaines interviennent dans la transcription inverse du génome viral et dans son intégration au génome cellulaire. D'autres éléments importants se retrouvent dans les LTRs. La boîte « TATA », qui signe le début de la transcription en ARN messager ainsi qu'un signal de polyadénylation. L'élément TAR participe à la régulation de la transcription de l'ADN proviral en ARN messager et ARN génomique par la protéine Tat.

## 2.4. Cycle de multiplication

### 2.4.1. Tropisme cellulaire du VIH

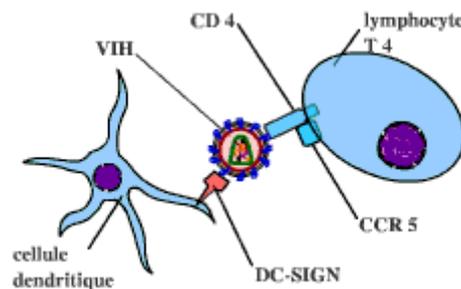
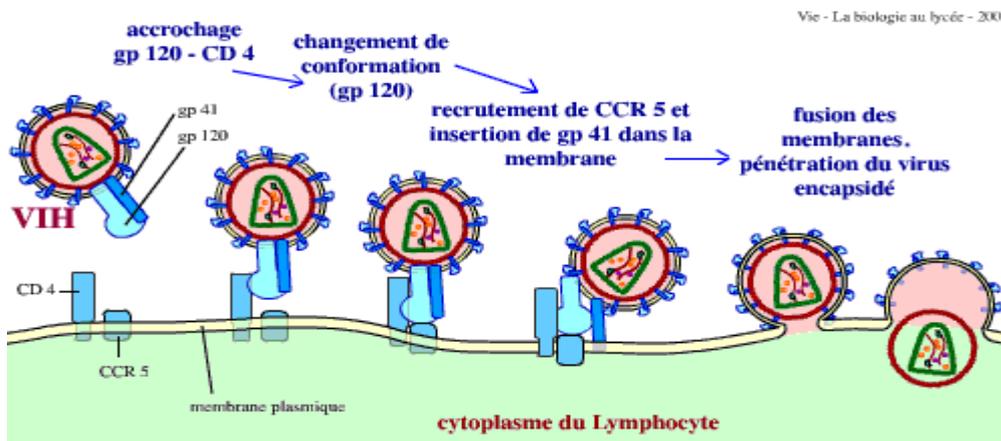
Le VIH possède un tropisme pour les cellules exprimant la molécule CD4 à leur surface : les lymphocytes T, les monocytes /macrophages et les cellules dendritiques. Deux types de souches virales sont identifiées en fonction du tropisme ; Les virus M-tropiques (pour macrophage tropique) et virus T tropique (pour lignée cellulaire T tropique).

La boucle V3 de la gp 120 joue un rôle important car elle influence le tropisme pour les macrophages ou les cellules de la lignée T [79] ; ceci a été confirmé par la découverte des co-récepteurs à savoir la fusine CXCR4(CXC chemokine receptor 4)[26] et la CCR5 (CC chemokine receptor5) [23] destiné respectivement aux isolats T tropiques et aux isolats primaires M tropiques. C'est **la co-expression** de la molécule CD4 et des co-récepteurs qui permet la pénétration cellulaire des souches virales.

Ces données sur le tropisme ont permis de classer les souches virales en isolats X4 (T-tropiques), R5 (M-tropiques) et R5X4 (dual tropiques) [5]. En plus

de CD 4 et d'un co-récepteur (par exemple, ici, CCR-5), un troisième type de récepteur serait également présent : un **transporteur**.

Ce transporteur serait la protéine DC-SIGN : elle est portée par les cellules dendritiques présentatrices d'Antigènes, localisées sur l'épithélium muqueux. En se fixant sur cette protéine, le virus du SIDA deviendrait plus résistant vis à vis du système immunitaire. Les cellules dendritiques migrent de plus vers les ganglions, où se trouvent de nombreux lymphocytes T4...



**Figure N° 4 : Corécepteurs et tropisme cellulaire des VIH [90]**

### 2.4.2. Etapes du cycle répliatif du virus.

Le VIH est un retrovirus, il a donc besoin d'intégrer le noyau de la cellule pour détourner le fonctionnement cellulaire et assurer sa répliation. Plusieurs étapes sont schématisées.

La première étape est celle de la **pénétration** ; l'attachement du virus à la cellule hôte se fait par l'interaction spécifique entre la gp 120 et son récepteur cellulaire de haute affinité, la molécule CD4. Cette interaction permet une modification structurale de la gp 120, aboutissant à la reconnaissance de cette protéine par les co-récepteurs. Pour pénétrer dans la cellule, la protéine de l'enveloppe plus interne le gp 41 active la fixation et permet la fusion des membranes virale et cellulaire. Le matériel infectieux du virus est alors injecté dans la cellule désormais contaminée.

L'étape suivante est la **transcription** ; les informations génétiques du VIH sont sous forme d'ARN. Pour assurer l'intégration de ce matériel génétique à celui de la cellule hôte, l'ARN est rétro transcrit en ADN double brin par la transcriptase inverse.

La troisième étape est celle de **l'intégration** ; L'ADN viral linéaire est transporté dans le noyau sous forme d'un complexe nucléoprotéine de pré-intégration qui contient la protéine p17, Vpr et l'intégrase. Cet ADN est intégré sous forme de pro-virus dans le génome de la cellule hôte grâce à l'intégrase virale.

La prochaine étape est la **synthèse** ; cette étape se déroule au niveau du cytoplasme cellulaire et elle correspond à la traduction des ARN messagers en protéines de régulation de la synthèse (Tat, Rev et Nef ) dont le rôle est la régulation de la synthèse des protéines de maturation (Protéase virale, Vif, Vpr et Vpu) et les protéines de structure (Gag, Pol et Env).

Cependant ces éléments ne sont pas encore prêts pour « l'assemblage » ils doivent subir une étape de maturation.

La suivante étape est la **maturation** ; les protéines formées précédemment n'étant pas mures, elles doivent subir l'action d'une enzyme qui est la protéase, elle même formée dans l'étape de synthèse. Elle permet d'ajuster la structure des protéines en coupant les morceaux superflus. L'action de cette enzyme est indispensable pour la création de virus viables.

Le **bourgeonnement** est l'étape finale durant la quelle les virus formés quittent la cellule. Le VIH enfonce la membrane cellulaire, s'entoure de celle-ci et sort de la cellule. Il est alors entouré de membrane cellulaire, qui lui procure une protection supplémentaire.

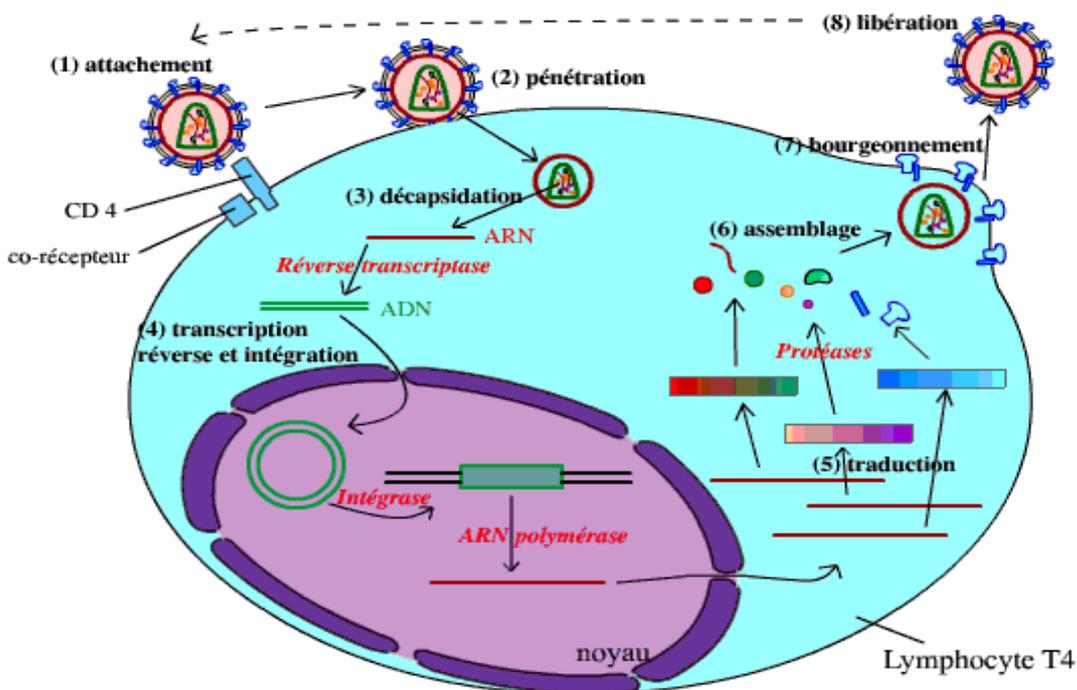


Figure N°4 :Cycle de réplication du VIH [90].

## 1. Différents types de variabilité

### 1.1. La variabilité génétique

Deux types de VIH ont été identifiés à nos jours ; le VIH-1 responsable de la pandémie actuelle et le VIH-2 endémique en Afrique occidentale.. Ils sont génétiquement distincts avec une divergence génomique de l'ordre de 60%. Ils sont tous caractérisés par une diversité de leurs séquences nucléotidiques.

#### Le déterminisme

La diversité génétique est due à une forte réplication virale et une faible fidélité de la reverse transcriptase et plusieurs facteurs contribuent à ces phénomènes. Ces facteurs concernent le virus lui même mais aussi son hôte.

#### ➤ **Faible fidélité de la reverse transcriptase et forte réplication virale**

La diversité des VIH est une des caractéristiques majeures de ces virus. Elle est liée aux erreurs d'incorporation de nucléotides qu'effectue la reverse transcriptase, lors de la rétro transcription de l'ARN viral en ADN, car elle ne possède pas d'activité exonucléasique de correction. Ce taux d'erreurs est de 1 à 10 mutations par génome et par cycle [13]. Par ailleurs, la dynamique de la réplication est très élevée, avec une production de l'ordre de 1 à 10 milliards de virus par jour [36] .

#### ➤ **Pressions de sélection et quasi-espèces**

Les quasi-espèces sont des variants génétiquement semblables qui apparaissent au cours de l'infection sous l'influence de la réplication et de la pression de sélection, elles ont un taux de divergence de l'ordre de 1 à 5%.

La variabilité n'est pas la même sur le tout le génome viral, les gènes de régulation apparaissent plus conservés que les gènes codant pour les protéines de structure. En effet le gène *env* est plus variable que le gène *gag*, le gène *pol* est le plus conservé. C'est l'analyse des gènes *env* et *gag* qui est la plus utilisée pour étudier la diversité génétique. Le gène *env* présente une très grande variabilité due certainement à une réponse à la pression du système immunitaire, ce qui permet au virus de développer un polymorphisme au niveau des protéines d'enveloppe très immunogènes, occasionnant un échappement aux réponses humorale et cellulaire.

La variabilité reflète d'une manière générale l'adaptation du virus à son environnement, ce qui lui permet de résister aux antirétroviraux, ce qui lui permet d'étendre son tropisme ou d'échapper aux réponses immunes de l'organisme.

## **1.2. La variabilité biologique**

### **1.2.1. Variants M tropique/ T tropique**

En fonction du tropisme et des co-récepteurs utilisés, les souches virales peuvent être subdivisées en virus M-tropique (pour macrophage tropique) et virus T tropique (pour lignée cellulaire T tropique). La découverte des co-récepteurs a permis de mieux comprendre le tropisme viral. La fusine ou le CXCR4 fut le premier à être découvert et sa co-expression avec la molécule CD-4 sur les lignées cellulaires T les rend permissives à ces dernières d'où le nom de virus T tropique par opposition aux isolats M tropiques qui eux utilisent un récepteur appelé CCR5 (CC Chemokine receptor 5).

Ce phénomène a permis une classification des souches en isolat X4 (T-tropiques), R5 et R5X4 (dual tropique).

### 1.2.2. Variants Rapid/ High et Slow/ Low

Parmi les virus isolés des PBMC, certains se multiplient rapidement *in vitro* et présentent une réplication très élevée, ils sont désignés par le terme de variants Rapid/High. Par contre d'autres ont une réplication faible et se multiplient lentement. Selon leur capacité de réplication *in vitro* dans les PBMC, ces variants se subdivisent en trois groupes :

- sous-groupe I : virus ne se multipliant ni dans les PBMC ni dans les lignées cellulaires.
- Sous-groupe II : virus se multipliant dans les PBMC seulement
- Sous-groupe III : virus se multipliant dans les PBMC et dans les lignées cellulaires.

### 1.2.3. Variants NSI et SI

L'effet cytopathogène des isolats VIH-1 correspond à leur capacité à former des syncytia *in vitro*, dans des cellules de la lignée MT-2. On distingue les souches virales capables d'induire des syncytia appelées variants SI (syncytium Inducing) et des souches qui n'induisent pas de syncytia appelées variants NSI (Non-syncytium inducing). Les variants NSI sont présents tout au long de l'infection alors que la présence de variants SI semble être associée à la maladie. Le phénotype SI ou NSI corrèle avec le tropisme, en effet les isolats R5 sont en général NSI et les isolats X4 sont SI.

### 1.3. La variabilité antigénique

La diversité antigénique des variants viraux est étudiée par une technique de sérotypage à l'aide d'oligopeptides synthétiques représentant les peptides antigéniques de la boucle V3 de la glycoprotéine membranaire gp 120.

Ces études se sont particulièrement intéressées sur le VIH-1 groupe M de différentes parties du monde et la technique de choix est le sous-typage sérologique (SSEIA, pour Subtype Specific Enzyme Immunoassay) utilisant le principe de l'inhibition par un excès de peptides en phase liquide. Ce test est un ELISA en microplaque dont la phase solide est sensibilisée par un mélange équimolaire de 5 peptides majeurs A et E correspondant aux peptides consensus V3 des 5 sous-types majeurs A à E. Chaque échantillon est testé dans 7 puits en présence de différentes solutions d'inhibition, contenant soit les peptides A, B, C, D, ou E (respectivement dans les puits 1 à 5), soit un mélange des 5 peptides (puits N°7), soit uniquement le tampon de dilution (puits N°6). Après incubation et lavage, les étapes suivantes sont celles d'un test ELISA indirect standard faisant intervenir conjugué et substrat. Pour chaque échantillon sont identifiés :

- Le sérotype correspondant au peptide donnant l'inhibition la plus importante (réaction immunodominante)
- Un profil sérologique correspondant aux 5 pourcentages d'inhibition constatés avec chacun des 5 peptides A à E.

Les études montrent que le typage sérologique apporte un résultat pour environ 90% des sérums, l'impossibilité de sérotyper étant fréquemment liée à l'absence de réactivité anti-V3 lors des prélèvements précoces réalisés à proximité de la séroconversion.

## 2. La diversité du VIH-1

### 2.1. Caractérisation des isolats

L'analyse directe du génome viral permet la classification et l'étude de la diversité des VIH.

#### 2.1.1. Séquençage nucléotidique

C'est la première étape de la caractérisation, qui décrypte les informations contenues dans une portion du génome viral. Le séquençage du génome viral peut se faire sur l'ADN proviral ou sur l'ARN après rétrotranscription. La séquence peut être déterminée sur les produits d'amplification de PCR (polymerase Chain Reaction).

Deux groupes de méthodes sont utilisés :

- **Les méthodes chimiques (Maxam et Gilbert)**

Elles utilisent de l'ADN purifié sous forme d'un seul brin, marqué au  $^{32}\text{P}$  à l'extrémité 5', et reparti en quatre fractions qui subiront chacune une réaction chimique de coupure de brins par retrait spécifique des bases G, A, C, G+A, ou T+C. Les conditions de ces réactions sont telles que chaque brin n'est coupé qu'une seule fois, et tous les fragments possibles seront obtenus en quantité équivalente. Après électrophorèse sur gel de polyacrylamide, l'enchaînement des fragments sur les quatre pistes de l'autoradiogramme permet de déduire la séquence du brin traité.

- **Les méthodes enzymatiques (Sanger).**

Ces méthodes utilisent des fragments marqués, résultant d'une série d'élongations avortées par l'incorporation de di-désoxynucléotides (ddNTPs) marqués. Ces derniers ne possédant pas d'hydroxyle en C<sub>3</sub>, il n'y a plus la

possibilité de formation de liaison phosphodiester nécessaire à la poursuite de la synthèse d'ADN. Les quatre types de ddNTPs sont ajoutés en faible quantité de manière à avoir autant de fragments avortés que de fois où la base correspondante est représentée.

De même :

- l'ADN à séquencer peut être amplifié par PCR, ou bien cloné dans un vecteur simple ou double brin.
- On utilise la Taq polymérase à faible température pour éviter des structures secondaires de type « épingle à cheveux ».
- Le marquage peut se faire au  $^{35}\text{S}$ , mais pour le séquençage automatique, on utilise des fluorochromes de couleur différente pour chaque base. On peut marquer :
  - Soit les quatre types de ddNTP, et faire la réaction de séquence dans un tube unique.
  - Soit l'amorce, de façon à avoir quatre types qui serviront chacun à une réaction de séquence avec des ddNTPs non marqués. Puis les produits des quatre réactions seront mélangés.

Dans les deux cas, les produits des réactions sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, au niveau du séquenceur automatique. Les signaux correspondant à chaque type de base sont détectés par un photomètre à laser disposé en bas du gel et relié à un ordinateur qui restitue l'image virtuelle de celui-ci, ainsi que les histogrammes permettant la déduction de la séquence nucléotidique du fragment d'ADN étudié.

### 2.1.2. Comparaison des séquences

Les séquences peuvent être comparées par calcul des distances génétiques ; la distance constitue le nombre de substitutions réalisées au cours de l'évolution entre deux séquences, rapportée au nombre de sites des séquences.

La comparaison peut être effectuée sur la base des mutations synonymes (MS) et non synonymes (NMS). Une MS (conservation de l'acide aminé) est une position qui n'est pas soumise à une sélection. Une NMS est un changement de l'acide aminé qui est soumis à une sélection qui peut entraîner une résistance aux antirétroviraux ou un échappement à la réponse immune, on peut également avoir une mutation létale. Cette comparaison des MS et NMS permet de mieux évaluer la variabilité des VIH en complément avec les analyses phylogénétiques.

### 2.1.3. Analyse des séquences : La phylogénie moléculaire

Le développement de la biologie moléculaire a vu l'utilisation des séquences génétiques des espèces comme marqueur de l'évolution. La phylogénie moléculaire a permis d'établir des liens génétiques des isolats de VIH et de comprendre leur évolution. Ces liens ont permis d'établir des arbres phylogénétiques qui sont caractérisés par deux paramètres :

- Leur topographie correspondant aux positions des nœuds : ancêtres communs "putatifs" à partir desquels se sont déroulés les événements évolutifs représentés sur l'arbre.
- Leur longueur qui est la somme des longueurs des branches (temps d'évolution).

Le logiciel Phylip (*Phylogeny Inference Program*) est un recueil de programmes développant plusieurs algorithmes de phylogénie :

- **Méthode du plus proche voisin ou *Neighbour-Joining*** : Elle permet une recherche séquentielle de taxons les plus proches, et de trouver un arbre dont la longueur totale sera la plus courte. Ceci est possible à partir d'une matrice de distances obtenue en comparant les séquences deux à deux et en déterminant un "indice de similarité ou de dissimilarité" pour chaque combinaison de séquences.
- **Méthode de parcimonie, *parsimony*** : beaucoup plus lente cette méthode regroupe les séquences selon les critères du nombre de minimum d'événements génétiques (substitutions). Cette méthode est peu efficace lorsque les séquences présentent des taux de mutations élevés comme c'est le cas avec le VIH, le meilleur arbre phylogénétique sera celui qui nécessite le minimum d'échanges entre les séquences.
- **Méthode du maximum de vraisemblance ou *Maximum likelihood*** : elle considère chaque position et séparément pour fournir une estimation de la probabilité ou vraisemblance associée à chaque embranchement et à chaque distance entre deux nœuds. Toutes les topologies possibles sont examinées afin de retenir celle de l'arbre qui donne le maximum de vraisemblance. Mais cette méthode aussi lente ne peut s'appliquer qu'à un petit nombre de taxons.

Quelque soit le procédé suivi, un arbre phylogénétique peut être obtenu par la **méthode du bootstrap** qui consiste à des ré échantillonnages successifs de données (100 à 1000 fois) pour estimer la probabilité de répéter un groupement par l'analyse d'une nouvelle matrice de données avec la même méthode de reconstruction. On considère qu'un nœud est significatif au risque de 5% lorsqu'il est retrouvé au moins dans 95% des ré échantillonnages.

L'introduction d'une séquence extérieure ou "racine" permet d'avoir une indication sur l'ordre chronologique de survenue des divergences. Ainsi, pour les séquences des souches de VIH-1 groupe M, la racine couramment utilisée est une séquence du SIV cpz.

## 2.2. Classification des isolats du VIH-1

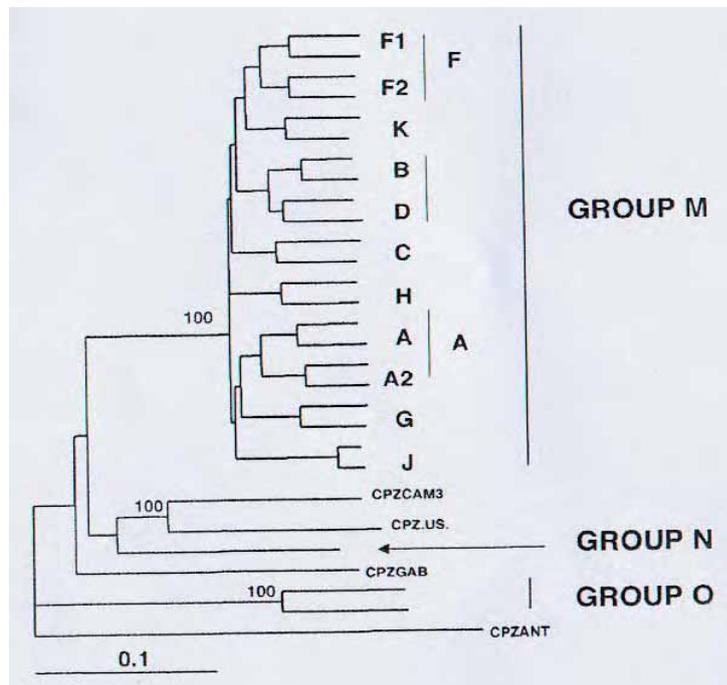
Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) a été isolé pour la première fois en 1983. L'analyse des séquences génétiques du VIH des isolats viraux a montré une diversité des souches virales VIH-1 qui ont tout d'abord été classés selon leur origine géographique en variants européens, nord américains, et variants africains. En 1992, une classification phylogénétique des VIH-1 a été établie définissant une structure cladogénétique de la diversité virale [60].

A l'époque, cinq clades de A à E étaient identifiés. La description des variants très divergents a conduit à diviser l'ensemble des souches VIH-1 en deux groupes : **M** pour Major et **O** pour Outlier [11]. En 1998, un 3ème groupe divergent des deux premiers a été identifié et est représenté par quelques isolats provenant de patients camerounais ; il s'agit du groupe **N** pour non M et non O [78].

En l'an 2000 une révision taxonomique a retenu quatre catégories pour l'appartenance au VIH-1. Elles sont représentées par Groupe, Sous type, Sous-sous types et forme recombinante circulante.

- Le groupe représente les distinctives lignées du VIH-1(M, O et N)
- Le sous-type désigne les différentes classes dans le groupe M
- Le sous-sous-type désigne une subdivision à l'intérieur du sous-type

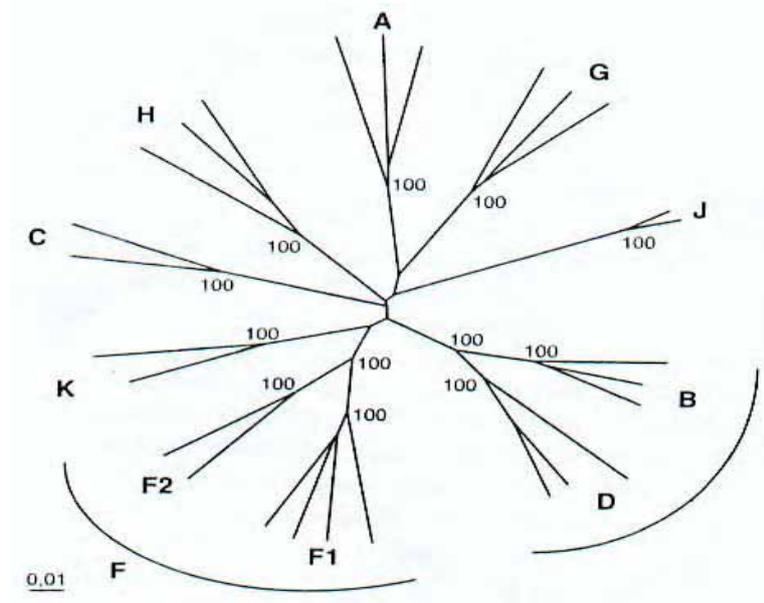
- Les CRFs qui désignent des souches recombinées.



**Figure N° 6 : Représentation des liens évolutifs entre les différents variants non recombinés du VIH-1 au sein de la lignée HIV-1/SIV cpz [69].**

### 2.2.1. Le Groupe M

La composition actuelle du groupe M est de 9 sous-types « purs » (A, B, C, D, F, G, H, J et K) car les virus des prototypes E et I dans l'enveloppe sont des recombinants, avec des fractions importantes du génome appartenant à d'autres sous-types.



**Figure N°7 : Les liens phylogénétiques entre les différents sous-types « purs » du groupe M [69].**

### 2.2.1.1. Les différents sous-types du groupe M

#### Le sous-type A

Très répandu en Afrique, ce sous-type est très hétérogène : il est sans doute le sous-type qui possède le plus de séquences variables avec des différences moyennes entre sous-types de l'ordre de 30%. Les phénomènes de recombinaison expliquent l'importante divergence au sein du sous-type A, ce qui le rend très complexe.

#### Le sous-type B

Il regroupe les isolats rencontrés dans les pays industrialisés. Deux groupes de variants se distinguent des souches habituelles européennes et américaines. Ces clusters correspondent à deux foyers géographiques : l'un au

Brésil et l'autre en Thaïlande. Ils sont caractérisés par une séquence particulière d'acides aminés qu'ils présentent au sommet de la boucle V3 de la gp120.

### **Le sous-type C**

Il est le plus répandu à travers le monde. Des foyers épidémiques géographiques peuvent être distingués en Afrique Australe, en Ethiopie et en Inde.

### **Le sous-type D**

Des études montrent la ressemblance entre les sous-types B et D [14]. Dans les reconstructions phylogénétiques, le sous-type D est toujours à proximité du B et la divergence entre ces deux sous-types est comparable à celle de certains isolats au sein du sous-type A et du sous-type F.

### **Le sous-type F**

Il était divisé en deux clusters géographiquement distincts : le brésilien et le roumain [3]. La divergence au sein de ce sous-type n'est pas importante.

Le sous-type F africain est plus divergent, ce qui a conduit à le subdiviser en 3 clusters : F1, F2 et F3 [87].

### **Le sous-type G**

Il a été défini sur la base des gènes env et gag, plus tard des séquences entières G ont été caractérisées [8;29]. Jusqu'alors, ce sous-type était considéré comme un sous-type recombinant. En effet tous les isolats identifiés possédaient des séquences hybrides A/G, de structure complexe. Comme pour le sous-type A, il est impliqué dans de nombreuses recombinaisons, ce qui ne rend pas facile l'analyse de son génome.

## Les sous-types H, J et K

Peu de séquences de ces sous-types ont été caractérisés à nos jours.

### 2.2.1.2. Les recombinants et formes recombinantes circulantes

La recombinaison est une caractéristique des virus à ARN muni d'une transcriptase inverse assurant la rétrotranscription de l'ARN viral en ADN proviral. Pendant cette rétrotranscription la RT saute d'un brin ARN à l'autre induisant la synthèse d'un ADN hybride avec des fragments d'ARN distincts.

Une étude a montré que plus de 10% des souches répertoriées dans la banque de données de los Alamos étaient des virus recombinants [75]. En 1997, parmi les 25 génomes complets non-B de VIH-1 présents dans la banque de données 12 sont des recombinants inter-sous types dont 8 proviennent d'Afrique. 11 des 12 génomes hybrides impliquent le sous-type A, ce qui montre son rôle dans la diversité du VIH-1 et explique sa grande hétérogénéité.

Des études plus récentes ont répertorié de nombreux virus mosaïques avec une prévalence aux alentours de 10 à 20%. Ce phénomène est renforcé par le fait que la plupart des souches peuvent être géographiquement localisées dans les lieux où les sous-types identifiés co-circulent.

Certains génomes de virus mosaïques sont uniques ou limités à des petits groupes de transmission. Cependant, d'autres identifiés chez des sujets distincts semble jouer un rôle majeur dans l'épidémie globale du SIDA d'où leur nom de CRFs « Circulating Recombinant Forms ». Plusieurs CRFs ont été répertoriés pour le VIH-1 et leur désignation se fait par un numéro d'identification avec les lettres qui indiquent les sous-types impliqués. Si le génome contient des séquences provenant de plus de deux sous-types, les lettres seront remplacées par « cpx » pour « complexe ».

Environ 15 CRF ont été identifiés à nos jours :

### **CRF01\_AE**

Ces souches (CM240) initialement caractérisées sous-type E sont en fait des recombinants des sous-types A et E et sont appelées **CRF01-AE**. Les seules séquences non A sont retrouvés au sein des gènes *env*, certains gènes accessoires (*vif*, *vpr* et *nef*) et la *LTR*.. Ces souches circulent en Asie mais sont originaires de l'Afrique centrale [28].

### **CRF02\_AG**

La souche *IbNg* d'Ibadan, au Nigeria, a été initialement décrite comme une lignée divergente au sein du sous-type A, basée sur les séquences *env* et *gag*. Cette souche est reconnue comme un virus mosaïque avec des séquences alternantes des sous-types A et G, un groupe de virus semblables a été décrit en Afrique du centre et de l'Ouest [55], ce virus a été reporté en Taïwan.

### **CRF03\_AB**

Des virus mosaïques des sous-types A et B ont été décrits en Russie et appelé CRF03-AB avec pour référence *kal 153* . Il a été identifié pour la première fois en Kaliningrad chez des sujets utilisant les drogues dures par injection [48;51].

### **CRF04\_cpx**

L'isolat *94CY032* de Chypre a été initialement classé comme étant un recombinant des sous-types A/G/I [29;61] Le séquençage complet du génome a récemment montré que c'est un virus mosaïque complexe des sous-types A, G, H, K avec des régions non identifiées ( U ).

### **CRF05\_DF**

Cette souche virale est représenté par deux isolats que sont le *VI 1310* et le *VI 1961* isolés chez des patients belges probablement infectés par des sujets de provenant de la République démocratique du Congo [46].

### **CRF06\_cpx**

Deux isolats de ce CRF ont été séquencé, *BFP 90* du Burkina Faso [64] et *95ML94* du Mali [54].

Ce virus a été auparavant désigné "CRF06\_AGJ", mais des résultats récents [56] suggèrent que la région non identifiée appartient au sous-type K d'où la nouvelle appellation CRF06\_cpx et montrent que ce CRF circule dans plusieurs pays de l'Afrique de l'Ouest.

### **CRF07\_BC**

Ce virus est représenté par l'isolat *CN54*, une description de ce sous-type a été soumise en l'an 2000, [83] mais aucune séquence n'a été soumise à la base de données. Ce n'est qu'en 2001 que le séquençage du génome complet a été réalisé [76].

### **CRF08\_BC**

Quatre séquences semblables sont disponibles pour ce CRF ; les isolats *97CNGX-6F*, *97CNGX-7F* et le *97CNGX-9F*, [70] et le dernier nommé *98CN006* [76].

**CRF09\_cpx**

Les séquences de cette souche ne sont pas encore disponibles.

**CRF10\_CD**

La souche de référence est le *TZBF061*, à sa publication trois isolats ont été nommés avec les numéros suivants ; AF289548, AF289549 et AF289550 [45].

**CRF11\_cpx**

L'isolat qui représente ce virus mosaïque des sous-types A, G, CRF\_01AE, J ; est le *GR17*. Six isolats représentatifs ont été totalement séquencés et publiés ; un avec le numéro AF179368 [66] ; trois avec les numéros AJ291718, AJ291719 et AJ291720 [56] ; les deux derniers que sont AF492623 et le AF492624 [89].

**CRF12\_BF**

La souche de référence est le *ARMA159* est un recombinant des souches B et E. ce CRF est représenté par quatre isolats dont les séquences complètes ont été décrites en Uruguay et en Argentine. Ce sont respectivement ; le AY037279, AF285934, et le AF385935, AF385936 [84].

**CRF13\_cpx**

La souche de référence est le *96CM-1849* est un recombinant des sous-types A, CRF01\_AE, G, J [89].

**CRF14\_BG**

La souche de référence est le X397, ce CRF est représenté par six isolats dont les génomes complets ont été décrits en Espagne [19].

## CRF15\_01B

Ce CRF est recombinant des sous-types CRF01\_AE, B. la seule souche de référence a été isolée en Thaïlande et la séquence complète n'est pas encore disponible.

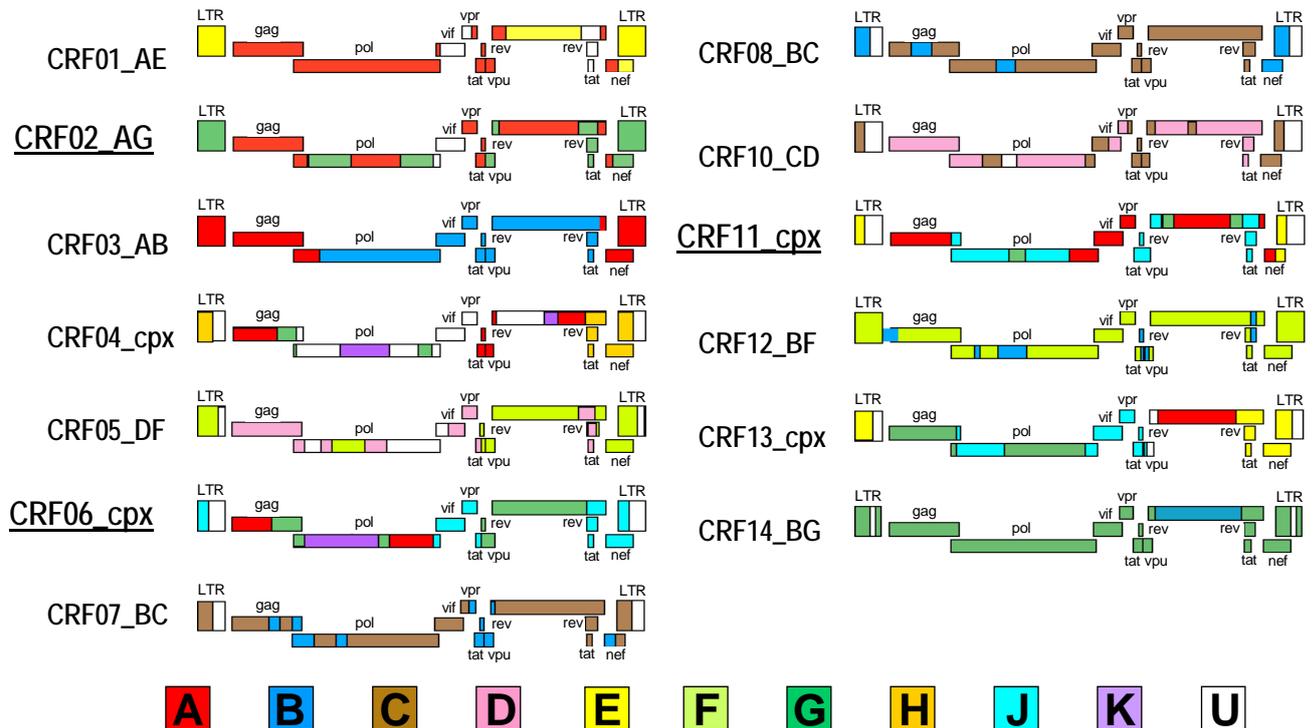


Figure N° 8 : Structure mosaïques des formes recombinantes circulantes (CRFs) [90].

### 2.2.2. Le Groupe O

Des séquences nucléotidiques des gènes *env* (plus particulièrement de la région C2-V3 de la gp 120) et de la région p24 du gène *gag* du VIH-1 obtenus

chez 7 patients d'origine camerounaise vivant en France. Ces patients sont sélectionnés sur la base qu'ils ont une séronégativité paradoxale vis à vis de certains kits d'ELISA et une réaction atypique au western blot. L'analyse de ces séquences montre que ces isolats sont beaucoup plus proches de la souche virale ANT70 isolée en 1990 en Belgique chez un patient d'origine camerounaise.

En 1994, un deuxième isolat (MVP5180), a été identifié chez un patient d'origine camerounaise et présentait 47% de divergence avec le VIH-1 et 51% avec le VIH-2. Au cours de cette année, un autre variant (VAU) fut isolé chez une patiente française sans lien avec le Cameroun [11]. Il fut alors proposé de réunir ces virus très divergents dans un groupe Outlier [11].

### 2.2.3. Le Groupe N

L'analyse génétique d'une souche virale (YBF30), isolée en 1995 chez une patiente camerounaise, a mis en évidence une séquence très divergente des séquences identifiées jusqu'à présent, aussi bien dans le groupe M que dans le groupe O [78].

## 3. Identification des VIH-1 groupe M

La technique de choix pour la caractérisation et la classification des isolats est le séquençage nucléotidique suivi d'analyses phylogénétiques.

Les techniques de sous typage actuelles impliquant surtout le VIH-1 groupe M ont été développées selon deux types d'approche. La première, moléculaire est basée sur l'analyse directe du matériel génétique du virus et définit le **génotype** ; la seconde est basée sur la réponse humorale dirigée contre le virus et définit le **sérotype**.

### 3.1. Le sérotypage

Les tests sérologiques sont faciles à utiliser, peu onéreux, et un grand nombre d'échantillons peut être testé à la fois. Les techniques immuno-enzymatiques (ELISA), utilisant les peptides synthétiques de la boucle V3 de l'enveloppe, ont été utilisées avec succès pour distinguer les infections dues au VIH1 des groupes M, N et O. Cependant, le sérotypage de la boucle V3 est moins performant pour la détermination des sous-types du groupe M. Ces ELISA sont utiles dans les endroits où un nombre limité de variants circulent, comme pour le sous-type B et CRF01-AE en Thaïlande ou le sous-type B et C en Afrique du Sud. Cette technique efficace pour distinguer les infections dues aux sous-types B et non B.

En 1999 Plantier et coll en étudiant la concordance entre sérotypage et génotypage ont souligné les limites du sérotypage surtout dans la discrimination entre les sérotypes A et C, car présentant au niveau de la boucle V3 des caractères phénétiques protéiques similaires.

### 3.2. Approches génétiques (génotypage)

#### 3.2.1. Heteroduplex Mobility Assay (HMA)

Cette technique est basée sur l'hybridation des simples brins d'ADN du virus inconnu et des ADN des plasmides de référence représentant les sous-types de VIH-1 ; des simples brins obtenus après dénaturation à 94°C[20]. Elle se fait sur l'ADN proviral des PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) ou sur de l'ARN du plasma. La première étape consiste à amplifier un fragment du gène à étudier (*env* ou *gag*) par PCR nichée. Les produits amplifiés sont alors mis en présence de plasmides de référence (amplifiés dans les mêmes conditions que l'ADN du virus inconnu) représentant les sous-types, avec lesquels ils vont former des hétéroduplexes dont la migration électrophorétique est ensuite

réalisée sur gel de polyacrylamide ; la vitesse de migration électrophorétique est conditionnée par l'homologie des séquences entre le virus et le plasmide. Le génotype correspond à la migration la plus rapide.

Le HMA est une technique performante, sensible et spécifique [49]. Des études ont révélé son efficacité dans les enquêtes d'épidémiologie moléculaire [6]. Le HMA est une technique adaptée aux pays en voie de développement avec son kit à coût abordable. C'est la méthode génétique la plus utilisée pour distinguer les sous-types de A à H du VIH-1.

Cette technique possède des inconvénients. En effet elle est **relativement longue et excessivement fastidieuse**. Le nombre d'échantillons analysés est limité en un temps court. Les isolats très divergents, les recombinants ou les représentants d'un nouveau sous-type sont généralement indéterminés.

Un HMA a été mis au point pour caractériser les génotypes du gag, et celui-ci peut distinguer les sous-types A purs des recombinants comme le CRF02\_AG et CRF01\_AE. L'utilisation simultanée des HMA *gag* et *env* permet d'avoir une idée sur la distribution des variants viraux et la fréquence des virus recombinants [34].

### 3.2.2. PCR spécifique de sous-type

C'est une stratégie d'amplification spécifique de sous-type ; c'est un moyen simple et rapide de discriminer le sous-type prédominant dans une région [68]. Cette idée a permis le développement d'une PCR spécifique du sous-type A, les échantillons non A sont par la suite analysés par la technique du HMA.

### 3.2.3. Autres méthodes

- **Combinatorial DNA Assay (CoMA)**

Ce test est basé sur les propriétés de « melting » (fusion-hybridation) de longs hétéroduplexes d'ADN. Il utilise comme le HMA, des souches virales de référence représentatives des différents sous-types.

- **PCR suivi d'hybridation par des sondes oligonucléotidiques**

Cette méthode est basée sur l'hybridation de deux simples brins complémentaire : l'un représentant une sonde spécifique de sous-type et l'autre le produit d'amplification de l'échantillon à déterminer.

- **Polymorphisme de restriction (RLFP, Restriction Fragment Length Polymorphism)**

Le polymorphisme de restriction permet de distinguer des sous-types génétiques sur la base d'un profil de digestion enzymatique spécifique de sous-type. Après amplification de fragments du génome proviral par PCR niché, les amplicons sont digérés par des enzymes de restriction prédéfinis en fonction des sous-types à discriminer. Les produits de la digestion enzymatique obtenus sont analysés après migration sur gel de polyacrylamide.

## 4. Conséquences de la variabilité

L'impact de ces différents groupes, sous-types et formes recombinantes du VIH-1 sur la transmissibilité et la progression de la maladie reste inconnu. Il est probable que l'importance de la diversité génétique entre les sous-types soit plus que suffisante pour causer des différences, mais leur mise en évidence pose

des problèmes méthodologiques importants. Néanmoins quelques constatations ont été faites.

#### **4.1. Variabilité et pathogénèse**

Il a été prouvé que le VIH-1 est beaucoup plus pathogène que le VIH-2 qui, aussi entraîne un SIDA dont la période asymptomatique est plus longue et la réplication virale plus faible.

Des études de pathogénicité in vitro sur des souches virales de sous-type B ont montré que des isolats dotés d'une forte réplication et d'un effet cytopathique sur des cellules MT-2 (formation de syncytia), étaient associées à une grande sévérité de l'infection. Il a été noté un changement de phénotype NSI à SI chez 50% des patients, ce qui n'est pas le cas avec le SI qui est commun à tous les sous-types du groupe M et O. Les variants SI sont beaucoup plus fréquents dans le sous-type D et rare dans le sous-type C[68].

Des études au Sénégal ont montré que les sujets infectés par les sous-types C et D avaient 8 fois plus de possibilités de développer un SIDA que ceux infectés par le sous-type B[44].

En Tanzanie, plus de 900 sérums de femmes enceintes ont été sous-typés par la technique de sérotypage V3. Ces études ont révélées que le sérotype C pourrait être plus pathogène que le sérotype A. [37].

#### **4.2. Variabilité et transmission du VIH**

Des observations sur les études d'épidémiologie moléculaire des VIH-1 et VIH-2 ont révélé une possibilité de différence de transmissibilité. En effet le VIH-2 est plus endémique que le VIH-1 en Afrique de l'Ouest mais avec une faible prévalence. Des études réalisées au Sénégal sur une cohorte de prostituées

sénégalaises ont montré que le risque de transmission par voie sexuelle est 5 fois plus élevé pour le VIH-1 que pour le VIH-2 [42]. La moindre transmissibilité a été décrite pour la transmission mère enfant [52].

Des études de tropisme cellulaire *in vitro* réalisées sur des cellules de langerhans, révèlent une meilleure sensibilité de ces cellules aux sous-types C (indiens) et E (thaïlandais) que pour les souches B isolées chez des homosexuels américains.

Il fut suggéré que le sous-type E se transmette préférentiellement par voie sexuelle, c'est la raison probable de sa diffusion rapide au sein de la population Thaïlandaise.

En Afrique du Sud, la communauté homosexuelle est infectée par le sous-type B alors qu'en population hétérosexuelle on retrouve le sous-type C [88].

#### **4.3. Variabilité et diagnostic**

Les tests de diagnostic ont été essentiellement développés pour le virus du sous-type B, qui est prédominant en Europe et en Amérique, mais s'avère très largement minoritaire dans le reste du monde. L'introduction dans ces pays de souches non B et d'isolats divergents du groupe O a soulevé le problème du dépistage de ces virus. Les tests de dépistage fondés sur les antigènes du sous-type B présentent une plus faible sensibilité pour la détection des infections dues aux sous-types non-B plus particulièrement les variants O [78]. Cette situation peut être corrigée par l'utilisation de peptides spécifiques O [53].

Il a été démontré également un manque de sensibilité des trousse de dépistage des anticorps anti-VIH chez des sujets infectés par des souches non-B en phase de séroconversion [22].

La mesure de la charge virale est également fortement influencée par la variabilité génétique. Les différentes souches de VIH ont une sensibilité relative

vis à vis des tests de mesure disponible (Amplicor HIV-1 Monitor, NASBA HIV-1 RNA QT et Quantiplex HIV-1 RNA : le test Amplicor est peu fiable sur les sous-types A et G du groupe M et inadaptée au groupe O. Le NASBA a une faible sensibilité pour la détection du sous-type A et la quantification des séquences G, il ne détecte pas non plus le groupe O [62]. Actuellement ces kits sont améliorés.

Cette défaillance est due au non appariement, pour des raisons de divergence génétique, de la séquence du virus avec l'unique couple d'amorces. La grande diversité des souches du VIH-1 nécessite une mise à jour continue des tests afin d'évaluer l'efficacité des sondes moléculaires utilisées.

#### **4.4. Variabilité et traitement antirétroviral**

Les médicaments antirétroviraux ont été essentiellement développés pour le virus du sous-type B qui est prédominant en Europe et en Amérique mais s'avère très minoritaire dans le reste du monde. La description de mutations associées à la résistance de certaines souches B, souligne l'impact de la diversité génétique sur les traitements.

Les antirétroviraux ne sont pas encore largement utilisés dans les pays en voie de développement, mais les résultats des études *in vitro* ont révélé que les virus du groupe O, et le VIH-2 sont naturellement résistants à l'une des grandes classes d'antirétroviraux ; les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse. On remarque également une variation dans la sensibilité au sein du groupe M. ainsi on a pu observer pour les souches non-B du VIH-1 des variations naturelles, apparaissant avec une fréquence élevée et conduisant à une résistance aux inhibiteurs de la protéase. Exemple de certains isolats du sous-type G qui ont une sensibilité naturelle plus faible aux IP (ritonavir et saquinavir) [21].

#### 4.5. Variabilité et développement de vaccin

La diversité génétique constitue un enjeu majeur pour le développement d'un vaccin efficace.

Plusieurs études réalisées sur des isolats de différents sous-types de VIH-1 ont été menées pour comprendre le pouvoir neutralisant des sérums ou plasmas de sujets infectés dans l'objectif de relever un rapport entre variabilité génétique et sérotype de neutralisation, malheureusement aucune réponse type à la neutralisation n'a été notifiée [63].

Une étude a rapporté une réponse spécifique des CTL (Cytotoxic T-Lymphocytes) aux différents sous-types, tandis que plusieurs travaux ont révélé une réactivité croisée inter-groupes et inter-sous-types chez des individus infectés par les sous-types non-B, et les bénéficiaires du vaccin (essai) de sous-type B. Ces données suggèrent que certains épitopes des CTL seraient conservés au sein des différents sous-types en particulier au niveau de la protéine p24 du gène gag, de la transcriptase inverse et le gp 120 [30].

Les structures conservées constituent un enjeu majeur pour la vaccination, car elles sont impliquées dans les interactions avec les cellules cibles ; elles devraient servir donc de support pour les prototypes vaccinaux.

Chez les agents pathogènes comme le VIH, les structures conservées sont les plus masquées, donc inaccessibles au système immunitaire alors que les structures variables sont, elles, très « visibles » par le système immunitaire, donc fortement antigéniques. Dès lors, ces dernières ont été utilisées dans des composés immunogènes ou des cibles de diagnostic, mais avec un succès très limité à cause justement de leur grande variabilité. Cependant les travaux récents sont porteurs d'espoir en ce sens qu'ils ont permis respectivement, de déduire

que des structures conservées de l'enveloppe pourraient induire une réponse humorale à large spectre indépendamment des sous-types de VIH, et que des structures de Tat induisent des réponses humorales et cellulaires efficaces.

Du fait de l'importance de la diversité antigénique, il serait moins évident qu'un vaccin élaboré à partir d'un seul type de virus soit en mesure d'induire une immunité contre tous les variants viraux. Il est nécessaire d'élaborer un vaccin qui puissent entraîner une réponse immunitaire suffisamment large protégeant contre tous les virus ; il s'agirait alors de stimuler les deux composantes de réponse immunitaire : l'immunité à médiation cellulaire et l'immunité à médiation humorale.

#### **4.6. Conséquences de la recombinaison**

La recombinaison rétrovirale provient de l'infection simultanée d'une cellule par deux provirus différents, permettant l'encapsulation d'un brin d'ARN de chaque provirus dans un virion hétérozygote. La caractérisation de plusieurs recombinants suggère que la co-infection avec des souches divergentes du VIH-1 est fréquente. En effet, la double infection par des sous-types différents a été rapportée dans les régions où des multiples variants co-circulent [73].

Cependant, la fréquence des virus recombinants est presque certaine d'augmenter parce que, une fois que la recombinaison s'est produite, elle ne peut être défait et, ainsi, la fréquence des souches des sous-types « purs » à tendance à décroître. Il reste à déterminer à quel moment de l'infection par le VIH une surinfection avec un autre virus est possible. Chez les macaques on a montré qu'une surinfection par des souches divergentes du VIH-2 était uniquement possible quand les anticorps n'étaient pas suffisamment développés [65]. En revanche, chez les chimpanzés, une surinfection par un virus CRF01\_AE, 32 semaines après une infection expérimentale par une souche du

sous-type B a conduit à une double infection avec une apparition rapide des virus recombinants [27].

Ces derniers résultats suggèrent qu'une surinfection ne soit pas limitée à la phase précoce de l'infection et que les réponses cellulaires et humorales ne soient efficaces contre les souches divergentes.

On a initialement pensé que la recombinaison entre les virus du groupe M et ceux du groupe O ne serait pas possible à cause de leur niveau élevé de divergence. Cependant, deux études ont documenté une recombinaison intergroupe chez deux patients différents du Cameroun [68]. La recombinaison entre ces souches si divergentes pourrait contribuer substantiellement à l'émergence de nouveaux variants de VIH-1 pourrait avoir des conséquences considérables sur le diagnostic par les tests sérologiques et moléculaires et sur le traitement. Ces observations mènent à des hypothèses selon les quelles des SIV et des VIH distants peuvent éventuellement se recombiner, particulièrement chez les individus exposés aux SIV par une transmission inter espèces. Les séquences distantes de SIV pourraient ainsi se propager plus efficacement dans la population humaine. Tandis qu'une double infection par HIV-1 et HIV-2 a été souvent rapportée dans les régions où ces deux virus circulent [43] aucune recombinaison n'a été encore décrite.

En effet, la recombinaison pourrait affecter les propriétés biologiques et la pathogénèse des souches de VIH. Plusieurs travaux ont montré que, sous la pression sélective des ARV, la recombinaison entre les souches ayant une sensibilité différente aux ARV peut avoir lieu, conduisant à des nouveaux variants de VIH-1 ayant une double résistance aux médicaments [57]. Les expériences in vitro avec les retrovirus félin et murin ont démontré que, sous une pression sélective appropriée, des infections mixtes peuvent produire des virus

recombinants avec un tropisme tissulaire, une pathogénicité et un choix d'hôte modifiés ou avec des changements dans les épitopes.

## **5. Epidémiologie moléculaire des VIH**

### **5.1. Répartition géographique des VIH-1**

Bien que le caractère pandémique soit établi, la répartition géographique est très inégale.

Les pays en voie de développement, les plus pauvres sont les plus touchés, avec plus de 60% des cas d'infections à VIH en Afrique sub-saharienne et 23% en Asie du Sud et du Sud-Est. Notons que cette pandémie est dynamique et dépend des facteurs socio-économiques, comportementaux et culturels.

### **5.2. Distribution des VIH-1**

#### **5.2.1. Le groupe M**

Le groupe M est impliqué dans la majorité des infections à VIH. Au début il a été surtout notifié dans les pays industrialisés où il a été le plus étudié.

La distribution mondiale des sous-types du VIH-1 groupe M est très hétérogène. En Afrique, tous les sous-types circulent.

#### **5.2.2. Les groupes N et O**

Le groupe N est représenté par quelques isolats retrouvés chez des patients originaires du Cameroun. Le groupe est principalement documenté vers la côte Ouest de l'Afrique Centrale.

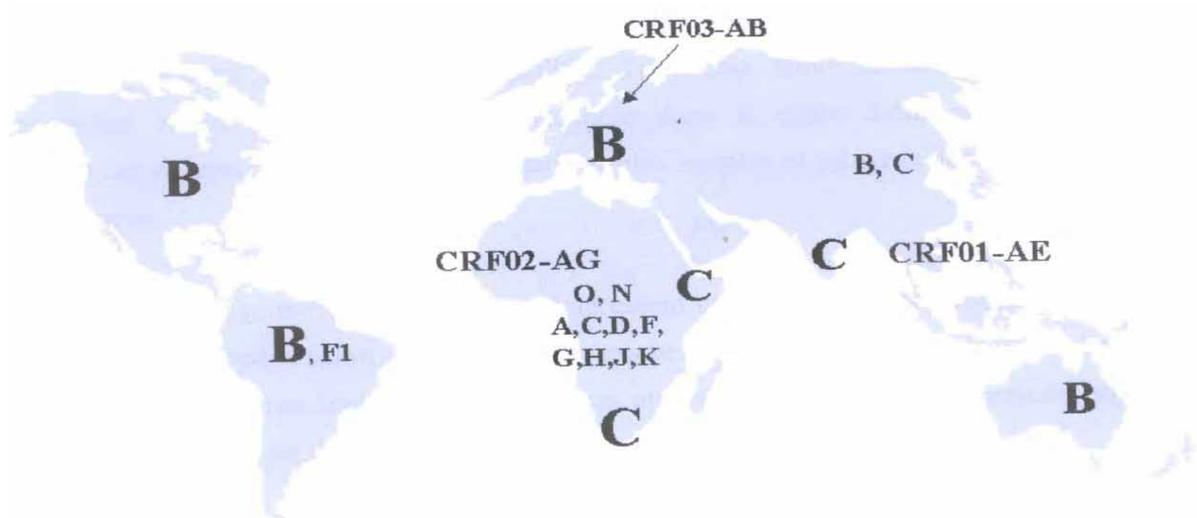


Figure N° 9 : Répartition géographique des sous-types du VIH [69].

## 1. Situation géographique et démographique

### 1.1. Cadre géographique

La République du Niger, pays situé en Afrique Subsaharienne, est limitée au nord par l'Algérie et la Libye, à l'Est par le Tchad, au sud par la République Fédérale du Nigeria et le Bénin, à l'Ouest par le Burkina Faso et au Nord-ouest par le Mali. De par sa superficie, le Niger est l'un des pays les plus vastes de l'Afrique de l'Ouest avec 1.267.000 km<sup>2</sup>. C'est aussi un pays continental et enclavé, sans débouché sur la mer. Le port le plus proche est situé à près de 1.000 km. Son climat est tropical de type soudanien caractérisé par deux saisons : une longue saison sèche d'Octobre à Mai et une courte saison pluvieuse de Juin à Septembre.



Figure N° 10 : Carte du Niger

## 1.2. Cadre démographique

La population nigérienne se caractérise par son évolution rapide.

Cette évolution s'est traduite par une croissance de 85% en 95 ans. La population du Niger est passée de 1.075.000 habitants en 1905 à 9.976.000 en l'an 2000 et 10.639.744 en 2002. Cette évolution rapide de la population est liée à plusieurs facteurs (les mouvements naturels, la mobilité de la population).

**Le taux brut de natalité** reste un des plus élevés du monde avec **49.95 naissances pour 1000 habitants** par an (2002)

**L'indice synthétique de fécondité** est passé de 7,3 enfants par femme en âge de procréer en 1960 à **7,5 enfants en 1998 et 7 en 2002**.

Les femmes se marient jeunes au Niger, par exemple en 1998, 47% des femmes sont déjà mariées à 15 ans et 98% à 25 ans. La polygamie est très fréquente par exemple selon l'EDS (Etude Démographique et Sociale) en 1998, 84.2% des femmes et 63.7% des hommes étaient en union au moment de l'enquête. Plus d'une femme sur cinq, soit **38%** vivaient en polygamie.

**Le taux de mortalité** qui était de 27 % en 1960, a connu une importante diminution. Il est passé de **22.4% en 1977 à 20% en 1988**. A nos jours 22,25 décès pour 1000 habitants.

**L'espérance de vie** connaît une amélioration passant de 41 ans en 1977 à 47 ans en 1988 et **48 ans en 1999**.

**Le taux d'accroissement** de la population nigérienne reste très élevé, il est de **2,8%** en 1977, **3,2%** en 1988 et **2,7% en l'an 2002**. Le temps de doublement de la population nigérienne est donc d'environ 26 ans depuis 1999.

### 1.3. Structure de la population nigérienne

L'évolution rapide de la population nigérienne est liée à la dynamique structurelle par âge et par sexe. La structure par âge de la population fait ressortir que près de la **moitié de la population nigérienne a moins de 15 ans**. La structure par sexe fait ressortir que les femmes représentent plus de la moitié de la population nigérienne (**50,4%**)

### 1.4. Environnement socioculturel

Au cours de son existence, toute formation sociale produit, capitalise et utilise un potentiel de savoir et de savoir - faire variés au moyen desquels elle assure ou tente d'assurer la sauvegarde de la santé physique et mentale de ces membres. Au Niger, les populations sont indéfectiblement attachées à leurs valeurs socioculturelles. C'est pourquoi elles font largement recours à la médecine traditionnelle. Cette situation se justifie au regard de la paupérisation croissante et des coûts de santé.

Aujourd'hui le VIH/SIDA est présent dans toutes les couches sociales, mais il demeure statistiquement sous évalué.

## 2. Situation socio sanitaire

L'organisation du système de santé est calquée sur le découpage administratif. Le système de santé comprend trois niveaux : central, intermédiaire et périphérique.

- *le niveau central* qui comprend le Cabinet du Ministre et le Secrétariat Général où sont rattachées sept Directions Nationales : la Direction des Etudes et de la Programmation (DEP), la Direction de la Protection sanitaire et des Etablissements de Soins (DPS/ES), la

Direction de la Formation et Gestion du Personnel (DFGP), la Direction de la Santé de la Reproduction (DSR), la Direction des Pharmacies, des Laboratoires et de la Pharmacopée Traditionnelle (DPhL/PT) et la Direction de l'Hygiène Publique et de l'Education pour la Santé (DHP/EPS);

- **le niveau intermédiaire**, qui est responsable de l'appui technique, est composé des Directions Régionales de la Santé Publique (7 DRSP) et de la Direction de la Santé Publique de la Communauté Urbaine de Niamey (DRSP/CUN);
- **le niveau périphérique**, qui correspondant au niveau opérationnel, est composé de 42 Directions Départementales de la Santé (DDS) ou Districts Sanitaires.

Sur le plan technique, la structure de l'offre de soins est également constituée de trois niveaux de prestations :

- **le premier niveau**, correspondant au niveau périphérique, est constitué de 42 Hôpitaux de District (HD) et de 417 Centres de Santé Intégrés (CSI). Ces derniers assurent les prestations de soins promotionnels, préventifs et curatifs à travers un paquet minimum d'activités (PMA). On note à ce niveau l'existence des comités de santé mis en place de concert avec les populations, avec pour mission la coordination des activités de santé, la planification, le suivi /évaluation et la gestion des médicaments. Parmi les stratégies retenues par le MSP, figure l'implantation de cases de santé avec des équipes de santé villageoises qui contribuent à améliorer la couverture sanitaire ;

- **le deuxième niveau**, correspondant au niveau intermédiaire, est composé de cinq (5) Centres Hospitaliers Régionaux (CHR) à Agadez, Diffa, Dosso, Maradi et Tahoua, et de deux (2) maternités (Zinder et Tahoua).
- **Le troisième niveau**, correspondant au niveau central, comprend trois (3) Hôpitaux Nationaux (Niamey, Lamordé et Zinder), la maternité centrale de Niamey (Issaka Gazobi) et les centres spécialisés où sont pratiqués des soins tertiaires.

### **Les Etablissements de santé**

Les établissements de santé sont les principales sources de production des DISS. Ils sont classés en quatre catégories :

- **les infrastructures sanitaires publiques classiques** qui comprennent trois niveaux :
  - Le 1<sup>er</sup> niveau avec les cases de santé, les Centres de Santé et l'Hôpital de District ;
  - Le 2<sup>ème</sup> niveau constitué des Centres Hospitaliers Régionaux et de l'Hôpital Communal Niamey ;
  - Le 3<sup>ème</sup> niveau comprenant les Centres de référence autres que les EPA et les EPIC : le Centre National Anti-Tuberculeux (CNAT), le Centre National Dermato-Lèpre (CNDL), le Centre National de Santé de la Reproduction (CNSR), les Maternités de Référence;
- **les Etablissements Publics à caractère Administratif (EPA) et les Etablissements Publics à caractère Industriel (EPIC)** dont les Hôpitaux nationaux de Niamey et Zinder, l'Hôpital Lamordé de Niamey, etc. ;

- **les infrastructures sanitaires publiques relevant d'autres secteurs** : il s'agit des centres socio sanitaires, des services de santé des Armées (dont l'Hôpital militaire de Niamey) et des infirmeries scolaires.
- **les infrastructures privées de santé** : hôpitaux et cliniques privés, cabinets, infirmeries d'entreprise, etc.

**Tableau I : Nombre de formations sanitaires publiques par département**

<b>Ft sanit Dpt</b>	<b>CSI</b>	<b>HD</b>	<b>CHR</b>	<b>Maternité Référence</b>	<b>Hôpital National</b>	<b>Total</b>
<b>Agadez</b>	28	4	1	-	-	33
<b>Diffa</b>	22	3	1	-	-	26
<b>Dosso</b>	60	5	1	-	-	66
<b>Maradi</b>	53	7	1	-	-	61
<b>Tahoua</b>	67	8	1	1	-	77
<b>Tillabéri</b>	74	6	-	-	-	80
<b>Zinder</b>	76	6	-	1	1	84
<b>CUN</b>	36	3	-	1	2	42
<b>TOTAL</b>	<b>416</b>	<b>42</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>468</b>

*(Source : DPS/ES/MSP)*

**Ft sanit : Formation sanitaire Dpt : Département**

**Tableau II : Répartition des établissements de soins privés par catégorie**

<b>Etablissement</b>	<b>Nombre</b>
<b>Hôpitaux</b>	3
<b>Infirmières d'entreprise</b>	30
<b>Salles de soins</b>	89
<b>Dispensaires</b>	8
<b>Cabinets Médicaux</b>	25
<b>Centres médico-sociaux</b>	18
<b>Cliniques</b>	13
<b>Cabinets de soins spécialisés</b>	9
<b>TOTAL</b>	<b>195</b>

*(Source : Rapport final Revue des dépenses publiques)*

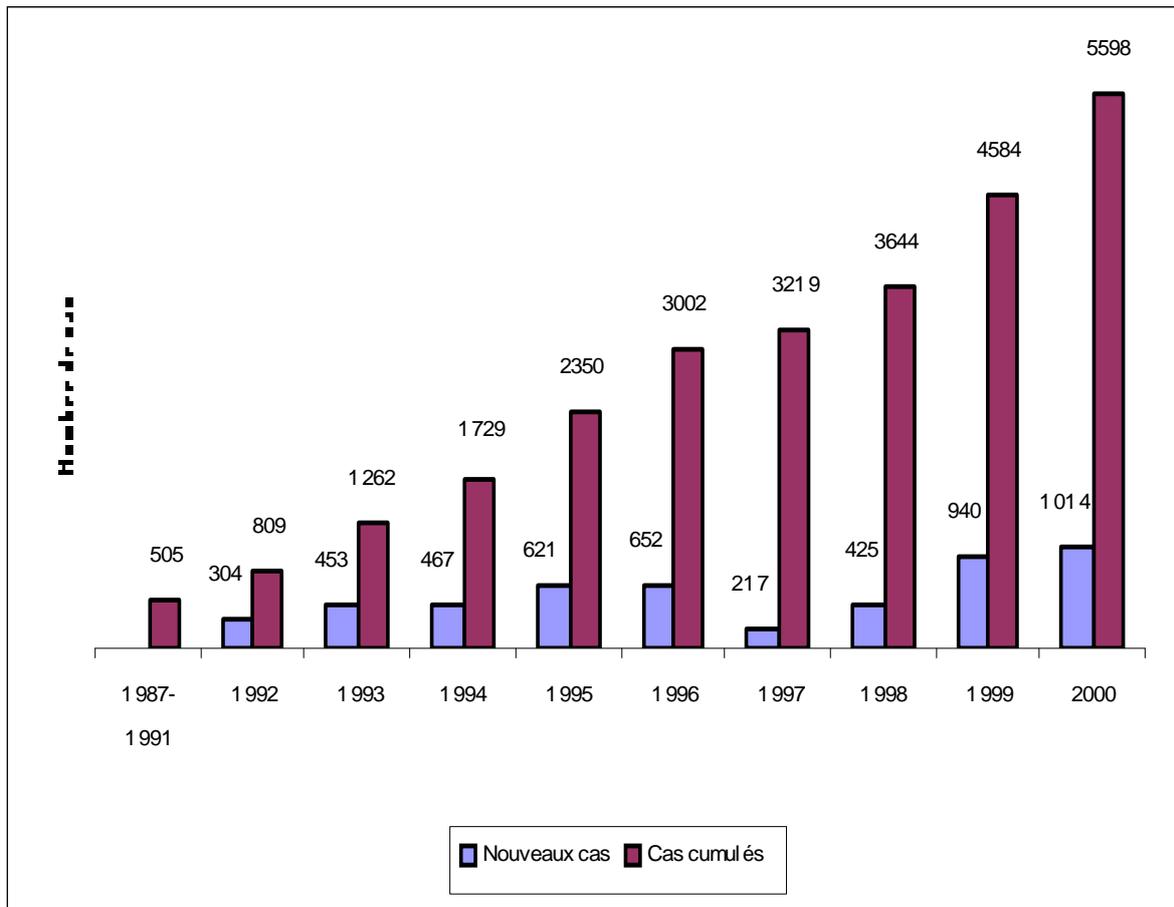
### **3. Situation épidémiologique du VIH/SIDA au Niger**

#### **3.1. Notification des cas de SIDA**

Le 1<sup>er</sup> cas de SIDA a été notifié au Niger en 1987 à Arlit, région d'Agadez dans le nord du pays.

Treize ans après, 5598 cas de VIH/SIDA cumulés ont été notifiés. En 2000, 1014 nouveaux cas de VIH/SIDA ont été dépistés et confirmés, soit une augmentation de 8 % par rapport à l'année précédente. Mais ces chiffres ne représentent que la partie visible de l'iceberg. Le nombre des victimes ne cesse de croître. Le graphique N°12 nous montre une évolution du nombre des nouveaux cas depuis l'apparition du premier cas en 1987. Compte tenu de la crise politique et économique pendant la période 1997-1999 avec pour

conséquence l'irrégularité d'approvisionnement en réactifs pour le dépistage, la diminution de l'enregistrement de nouveaux cas en 1997 ne reflète pas la situation réelle des cas de SIDA. De 1987 à 2000, il a été notifié 5598 cas d'infection à VIH au niveau des formations sanitaires du Niger. Toutefois la tendance ne permet pas de dégager une évolution continue du nombre de cas de VIH au cours des années, car la notification semble se faire en dents de scie d'une année à l'autre et dans chaque région.



(Source: PNLIS/IST Niger 2000)

**Figure N° 11 : Situation épidémiologique des cas de SIDA au Niger de 1987 à 2000**

Malgré les insuffisances du système de notification des cas de VIH/SIDA et les défaillances du système de séro-surveillance sentinelle chez les femmes

enceintes, on note une rapide expansion de l'épidémie dans la frange la plus productive de la population : 18 cas en 1987, 1014 nouveaux cas d'infections à VIH pour l'année 2000, parmi ces cas, on note 66% des sujets ont entre 20 et 49 ans. Le sexe ratio général homme/femme est de 1,85. Toutefois, ce ratio est de 0,25 pour les sujets de la tranche d'âge de 15 à 19 ans (soit un garçon pour 4 filles).

### **3.2. Décès dus au VIH/SIDA**

Les données sur les décès dus au VIH/SIDA, n'étant pas enregistrés au niveau de toutes les formations sanitaires, le total cumulé au 1<sup>er</sup> trimestre de l'an 2001 est de 95 cas. La majorité de décès par SIDA surviennent à domicile même pour les malades ayant eu la chance d'une hospitalisation.

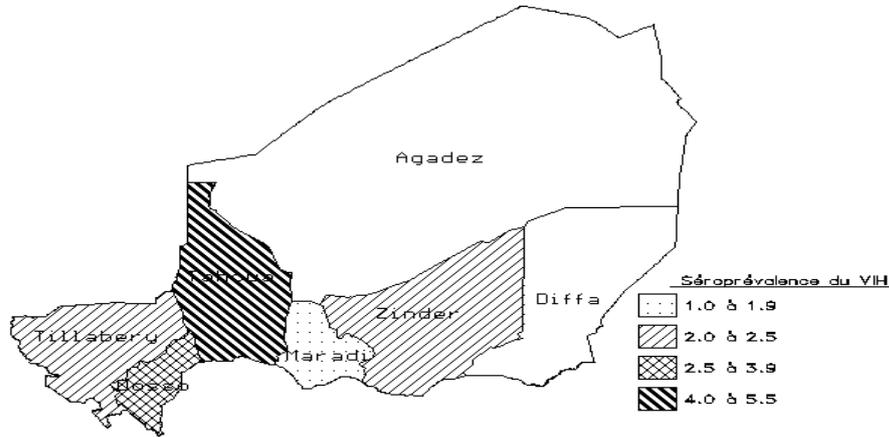
Cette situation ne reflète pas la réalité.

Les populations semblent prendre conscience de l'ampleur de la situation de l'infection à VIH. Selon une étude réalisée en Novembre 2001 par le PNLS/Niger (Programme National de lutte contre le SIDA), 337 cas présumés de SIDA, 108 décès attribuables au SIDA, 443 orphelins du SIDA et 111 veuves /veufs ont pu être répertoriés par les populations de la Commune Urbaine de Niamey III et de Tillabery.

### **3.3. Surveillance épidémiologique du VIH**

La surveillance épidémiologique se fait par le système de la séro-surveillance sentinelle. Chez les femmes enceintes, le taux de séroprévalence passe de 1,1 % en 1992 à 2 % en 2001 à Niamey, 1,4 % en 1992 à 5 % en 1999 à Tahoua et 0,6% en 1994 à 2 % en 2001 à Zinder. Dans le département de Tahoua la séroprévalence varie entre 4,25% dans la commune urbaine de Tahoua et 5,5% dans l'arrondissement de Konni en 2001, qui est située de 7 km

de frontière du Nigeria. Dans le département Dosso la séroprévalence du VIH chez les femmes enceintes aussi varie entre 2,5 % dans la commune urbaine de Dosso et 3,9 % dans l'arrondissement de Gaya, la ville frontalière avec le Bénin.



**Figure N° 12 : Cartographie de la séroprévalence du VIH chez les femmes enceintes dans les différents sites sentinelles au Niger en 2001.**

Les données de séroprévalence du VIH chez les femmes enceintes dans le département d'Agadez n'est pas encore disponibles pour l'année 2001. Toutefois il y a lieu de préciser qu'une étude réalisée en 1997 dans ce département indique une séroprévalence du VIH de 4,68 % chez les femmes enceintes. Aucune étude n'a encore été réalisée dans le département de Diffa.

Le taux de séroprévalence varie en fonction des groupes cibles et des localités, Toutefois il est plus élevé chez les prostituées où on enregistre les taux suivants :

- 28% au niveau de la communauté urbaine de Niamey
- 27,90 % à Dirkou (département d'Agadez) en 1995, 48% en 2001
- 35% à Firji (département de Maradi, village frontière avec le Nigeria) en 2000
- 50% à Komabangou (site aurifère dans le département de Tillabéry) en 2001

## **1. Historique et présentation de l'hôpital National de Niamey**

L'hôpital a été créé en 1892, alors que Niamey n'était qu'un petit village situé dans le quartier actuel de Gaweye. Il est situé sur une petite colline surplombant le fleuve Niger.

L'hôpital a été toujours un centre de référence pour le pays. A sa mission initiale de soins se sont ajoutées des missions nouvelles d'enseignement, d'éducation sanitaire et de recherche. En Avril 1992 une ordonnance le transforme en Etablissement Public à caractère Administratif (E.P.A.) doté de la personnalité civile et de l'autonomie financière. Il prend le nom d'Hôpital National de Niamey (H.N.N).

L'hôpital comprend les services suivants :

### Médecine et Spécialités médicales

- Dermatologie
- Médecine B1
- Médecine B2
- Médecine B3
- Médecine B4
- Pavillon A
- Pavillon D
- Pédiatrie A
- Pédiatrie B
- Phtisiologie
- Psychiatrie
- Rééducation kinésithérapie

### Services médico-chirurgicaux

- Aiguillage
- Anesthésie
- Urgences
- Réanimation

### Chirurgie et spécialités chirurgicales

- Bloc opératoire
- Chirurgie catégorie
- Chirurgie 4<sup>e</sup> section
- Chirurgie 5<sup>e</sup> section
- Chirurgie 6<sup>e</sup> section
- Urologie
- Post-opératoire
- Ophtalmologie
- O.R.L
- Stomatologie

### Services Médico-techniques

- Laboratoire
- Pharmacie
- Radiologie

### Services Généraux

- Hygiène et Assainissement
- Maintenance

- Service social

## **2. Le laboratoire de Bactériologie-virologie de l'HALD de Dakar**

Le laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'Hôpital Aristide le Dantec constitue le centre national de référence pour le diagnostic du SIDA et des MST.

Il est également le laboratoire de référence OMS pour le VIH-2 et centre collaborateur ONU SIDA.

Ainsi, il assure le contrôle de qualité des laboratoires de la sous région et constitue un centre de formation, de perfectionnement et d'expertise pour les laboratoires régionaux ainsi que ceux des pays limitrophes.

Il comprend :

- une unité de Bactériologie
- une unité de Virologie et d'immunologie
- une unité de Biologie moléculaire

## **1. Prélèvements (réalisés au Niger)**

Les prélèvements réalisés dans le cadre de cette thèse sont effectués sur tube contenant un anticoagulant (E.D.T.A).

On fait une ponction veineuse sur les sujets confirmés séropositifs présentant ou non les signes de la maladie.

La séparation lymphocytaire a lieu 6 heures de temps après le recueil du sang total.

## **2. Préparation des lymphocytes à partir du sang total (effectuée au Niger)**

### **2.1. Matériel et réactifs**

#### **Matériels :**

- centrifugeuse
- pipette
- tube sec de 10 ml
- portoirs\_pour tube de 10 ml
- pipettes de 5ml
- cryotubes de 1,8 ml
- stylo marqueur
- blouses
- gants

**Réactifs :**

- ficoll ou lymphoprep

**2.2. Manipulation**

Dans un tube de 10 ml,

- aliquoter 3 ml de ficoll
- Déposer lentement 5 ml de sang prélevé sur tube EDTA avec une pipette pasteur 10ml sur le ficoll. Faire attention à ne pas mélanger le sang au ficoll.
- Centrifuger 20 mns à 2500 rpm.

Pendant la centrifugation,

- Préparer les cryotubes nécessaires :

Deux cryotubes pour le plasma et un pour les lymphocytes par tube de sang manipulé.

**Noter le numéro et la date de prélèvement sur chaque tube et cryotube.**

Après centrifugation, le plasma, les cellules rouges, les lymphocytes et le ficoll se trouvent séparés en couches selon leur densité.

**Il est important de récupérer rapidement le plasma et surtout les lymphocytes à cause de la toxicité du ficoll.**

## SEPARATION DES LYMPHOCYTES

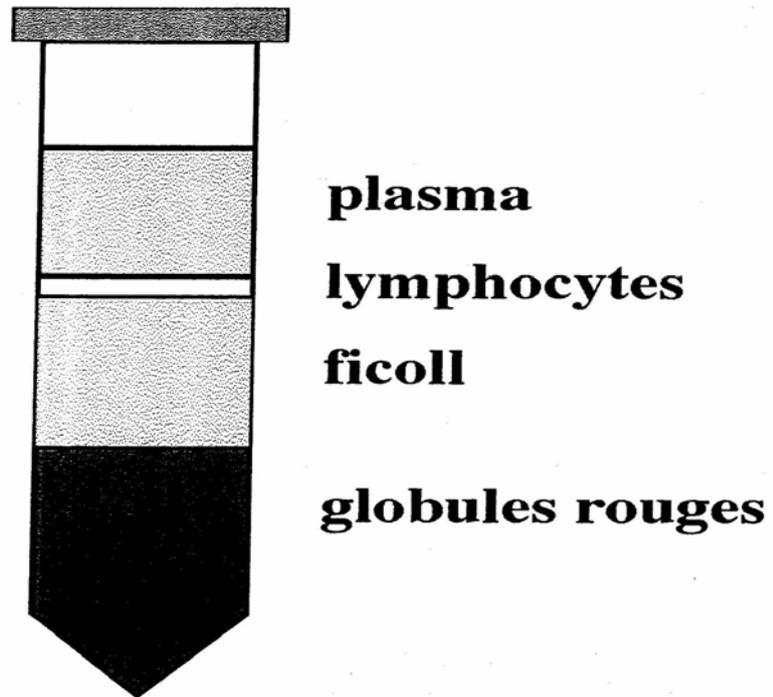


Schéma N° 1 : Séparation lymphocytaire en gradient de Ficoll

### 2.3. Conservation

La conservation a lieu dans une chambre froide de  $-40^{\circ}\text{C}$ .

### 2.4. Conditionnement et transport

Les cryotubes contenant les cellules et les plasmas sont délicatement emballés et rangés dans une caisse isotherme contenant des accumulateurs de froid.

### **3. Préparation du matériel biologique : Extraction de l'ADN (réalisée à Dakar)**

Toute étude de génétique moléculaire implique la disposition d'échantillons d'acides nucléiques. Les techniques d'extraction des acides nucléiques sont relativement simples. Il convient simplement d'éviter toute destruction enzymatique ou mécanique. En effet les acides nucléiques, qui sont stables dans la cellule intacte, deviennent très vulnérables à la digestion par les nucléases endogènes une fois la cellule lysée.

#### **3.1. Principe**

Les cellules sont traitées par un mélange de protéinase K et de détergent, ce qui a pour effet de libérer l'ADN nucléaire dans le milieu et de digérer les protéines qui lui étaient associées. L'ADN subit ensuite une série de purification sur colonne, d'adsorption sur membrane et d'élution pour l'obtention d'un concentré d'acide nucléique.

#### **3.2. Matériel et réactifs**

- **QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)**
- Rnase A à 1mg/ml en solution
- Ethanol à 96-100%
- Tubes eppendorf à 1,5 ml
- Micropipette automatique de 10, 100 et 1000  $\mu$ l
- Embouts pour ces Micropipettes
- Bain Marie à 37°C et 65°C
- Minifuge
- Vortex

- Sacs poubelles
- Autoclave
- Filtre
- Portoir pour tubes eppendorf
- Congélateur à (-20°C)
- Réfrigérateur
- Flotteur
- Gants
- Marqueurs stylo
- Chronomètre
- Papier buvard stérile ou papier aluminium

### **3.3. Manipulation**

- Lavage avec PBS 1X (500 µl) stérile des cellules 2500 Tr/mns pdt 5 mns ou 8000 Trs/mn pendant 1 mn.
- Jeter le surnageant et resuspendre le culot cellulaire dans 200 µl de solution de PBS stérile
  1. Ajouter 20 µl de solution de protéase QIAGEN dans les 200 µl de culot cellulaire
  2. Mettre 20 µl de Rnase pour augmenter le rendement
  3. Additionner 200 µl de tampon de lyse (Buffer AL), Vortexer 15 secondes
  4. Incuber à 56°C au Bain Marie pendant 10 mns
  5. Micro centrifuger les tubes de 1,5 ml pour chasser les bulles d'air à l'intérieur du couvercle

6. Additionner 200  $\mu$ l d'éthanol absolu (96-100%)

Vortexer pendant 15 secondes

7. Transférer doucement le contenu du tube de l'étape 6 dans la colonne disposant d'une membrane filtrante

Bien boucher, insérer la colonne dans un tube de 2 ml (fourni dans le kit) et centrifuger à 8000 tours/ mn pendant une mn.

Jeter le filtrat et replacer la colonne dans un autre tube de 2 ml

8. Ouvrir le tube contenant la membrane et ajouter 500  $\mu$ l de Tampon de lavage ( buffer AW1)

Fermer le tube et centrifuger à 8000 tours/ mn pendant une mn

Jeter à nouveau le filtrat et replacer la colonne dans un autre tube de 2 ml

9. Ouvrir la colonne QIAamp et ajouter 500  $\mu$ l de tampon de lavage (buffer AW2)

Fermer le tube et centrifuger à 14 000 trs/ mn pendant 3 mns

Si à l'issu de cette étape la membrane n'est pas évacuer de sa solution continuer à centrifuger jusqu'à épuisement.

10. Placer la colonne QIAamp dans un tube eppendorf propre de 1,5 ml (non fourni).

11. Jeter le tube contenant le filtrat et ouvrir la colonne QIAamp pour y introduire 200  $\mu$ l de tampon d'éluion ( buffer AE ), à défaut utiliser de l'eau distillée.

Incuber à la température ambiante pendant une mn et centrifuger à 8000 trs/ mn pendant une mn.

Ce dernier filtrat contient le matériel génétique (de l'ADN) qui servira à lancer la PCR.

## **4. Polymerase Chain Reaction**

### **4.1. matériels et réactifs**

#### **Matériels**

- Hotte
- **Appareil à PCR (PTC 100) (schéma)**
- Autoclave
- Tubes eppendorf à 1,5 ml
- Tubes eppendorf à 0,5 ml
- Micropipette automatique de 10, 100 et 1000  $\mu$ l
- Embouts pour micropipettes
- Portoir pour tubes eppendorf
- Gants
- Blouses
- Sacs poubelles
- Congélateurs
- Réfrigérateur

#### **Réactifs**

- Enzyme Taq polymérase
- Tampon enzyme

- MgCl<sub>2</sub>
- **Primers ou couple d'amorces**
- dNTP
- H<sub>2</sub>O mQ
- Ethanol à 70%
- Huile minérale
- Echantillon : ADN ou produit d'amplification

## 4.2. Les réactions PCR

Les pièces du laboratoire de biologie moléculaire sont disposées en deux zones ; la zone pré-PCR et la zone post-PCR de telle sorte que le sens de déplacements lors des manipulations soit unique et doit être respecté pour éviter les contaminations. En effet la moindre inattention et l'inobservance des précautions de manipulation entraîneraient des contaminations

### 4.2.1. Test de stérilité de la hotte et de la paillasse

*Avant de démarrer toute PCR sur du matériel biologique il convient de faire un essai de stérilité de la hotte et de la salle Pré-PCR..*

#### ➤ *Première ronde du test*

#### *Sous la hotte*

1. Préparer un « mastermix » pour la première ronde d'amplification test (n=3) :

H<sub>2</sub>O hotte + H<sub>2</sub>O paillasse + un contrôle négatif (eau distillée scellée)

➤ *Un mélange est préparé pour 4 échantillons pour tenir compte des pertes au cours du pipetage.*

- Toutes les réactions PCR sont conservées sur glace à l'exception de la taq polymerase qui es conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Mélangez en respectant l'ordre suivant :

(5x4= )	20 $\mu\text{l}$ de tampon 10x de PCR
(3x4= )	12 $\mu\text{l}$ de $\text{MgCl}_2$ (25mM)
(0,4x4= )	1,16 $\mu\text{l}$ de dNTP mix (25mM)
(0,17x4= )	0,68 $\mu\text{l}$ de 4538 (20 pmol)
(0,17x4= )	0,68 $\mu\text{l}$ de 4235 (20 pmol)
(35,76x4= )	143,04 $\mu\text{l}$ d' $\text{H}_2\text{O}$ bidistillée
(0,5x4= )	2 $\mu\text{l}$ de Taq ADN polymerase 2,5 U

(45 x4=) 180  $\mu\text{l}$  total (*pour trois réactions 50  $\mu\text{l}$*  )

2. Placer 45  $\mu\text{l}$  de mix dans chacun des trois tubes

	P1	H1	CN1
Mastermix 1	45 $\mu\text{l}$	45 $\mu\text{l}$	45 $\mu\text{l}$
Huile de paraffine	2 gouttes	2 gouttes	2 gouttes
échantillons	5 $\mu\text{l}$ (sur la paillasse)	5 $\mu\text{l}$ (sous la hotte)	3 $\mu\text{l}$ (sous la hotte)

P1 :  $\text{H}_2\text{O}$  conservée sur la paillasse

H1 :  $\text{H}_2\text{O}$  conservée sous la hotte

CN1 :  $\text{H}_2\text{O}$  stérile

- *Installer toutes les réactions PCR sur glace*
- *Etiqueter tous les tubes sur le coté avant PCR et vérifiez l'étiquette avant PCR.*

3. Placer les tubes des réactions sur glace immédiatement dans le thermocycleur chauffé (94°C)

4. Conditions d'amplifications :

Nombres de cycles	Programme du cycle		Commentaires
	Temps	Température	
1	2 min	94°C	Dénaturation initiale
35	15 sec	94°C	Dénaturation
	30 sec	50°C	Hybridation
	1 min	72°C	Extension
1	5 min	72°C	Étape d'extension supplémentaire
1	Indéfini	4°C	

5. Continuer la deuxième ronde de PCR

➤ *Deuxième ronde de PCR test*

1. Préparer un « mastermix » pour la deuxième ronde d'amplification test (n=4)

- *Un mélange est prévu pour 5 échantillons pour tenir compte des pertes au cours du pipetage.*
- *Conserver toutes les réactions sur glace, excepté la Taq ADN polymérase qui doit être conservé à - 20°C.*

**Sous la hotte**

Mélanger en respectant l'ordre suivant :

(5x5= )	25 µl de Tampon 1X
(3x5= )	15 µl de MgCl <sub>2</sub> 25 mM
(0,4x5= )	2 µl de dNTP 25 mM
(0,17x5= )	0,85 µl de 4327 20 pmol
(0,17x5= )	0,85 µl de 4481 20 pmol
(38,76x5= )	193,8 µl d'H <sub>2</sub> O
(0,5x5= )	2,5 µl de Taq ADN polymerase

---

( 48 x 5= ) 240 µl total (*pour quatre réactions 50 µl*)

2. Placer 48 µl de ce mélange dans chacun des quatre tubes

- *Installer toutes les réactions PCR sur glace*
- *Etiqueter tous les tubes*

	P2	H2	CN2	CN2'
Mastermix2	48 µl	48 µl	48 µl	48 µl
Huile	2 gouttes	2 gouttes	2 gouttes	2 gouttes
Echantillon	2 µl de P1 <b>sur la paillasse</b>	2 µl de H1 <b>sur la paillasse</b>	2 µl de CN1 <b>sur la paillasse</b>	2 µl d'H <sub>2</sub> O stérile <b>sous la hotte</b>

3. Placer les tubes de réactions sur glace immédiatement dans le thermocycleur chauffé à (94°C) pour prévenir les artefacts.

## 4. Conditions d'amplification :

Nombre de cycles	Programme du cycle		Commentaires
	Temps	Température	
1	2 min		Dénaturation initiale
25	15 sec	94°C	Dénaturation \ Amplification
	30 sec	50°C	Hybridation / PCR nichée
	1 min	72°C	Extension
1	5 min	72°C	Etape d'extension supplémentaire
1	Indéfini	4°C	

4. Les produits d'amplification de la deuxième ronde PCR seront utilisés pour une électrophorèse sur gel d'agarose.

5. résultats : Aucune amplification ne doit être remarquée.

#### 4.2.2. Multiplex DNA PCR

##### ➤ Première ronde de PCR

Le mastermix est préparé avec un mélange des deux types d'amorces *env* et *gag*.

##### Les amorces *env* de la 1<sup>ère</sup> ronde

**ED5** 5'-ATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG (6556-6581)

**ED12** 5'-AGTGCTTCCTGCTGCTCCCAAGAACCCAAG (7822-7792)

Ces amorces amplifient un fragment de 1,25 kb codant pour la région V1-V5 de la gp 120.

### Les amorces *gag* de la 1<sup>ère</sup> ronde

**H1G777** 5'-TCACCTAGAACTTTGAATGCATGGG (777-801)

**H1P202** 5'-CTAATACTGTATCATCTGCTCCTGT (1874-1898)

#### 1. Préparer un « mastermix » pour la **première ronde d'amplification** (n=10)

10 inconnu + 1 contrôle positif (pNL4-3) + 1 contrôle négatif (H20)

- *Noter qu'un mélange est préparé pour 13 échantillons pour tenir compte des pertes au cours du pipetage.*
- *Conserver toutes les solutions sur glace, excepté la Taq ADN polymérase qui doit être conservé à -20°C.*

Mélangez en respectant l'ordre suivant :

(32x13=)	416 µl d'H <sub>2</sub> O
(5x13=)	65 µl de tampon PCR 10X
(3x13=)	39 µl de MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
(0,5x13=)	6,5 µl de dNTP mix (20 mM)
(1x13=)	13 µl de ED5 (20 pmol)
(1x13=)	13 µl de ED12 (20 pmol)
(1x13=)	13 µl de H1 P202 (20 pmol)
(1x13=)	26 µl de H1 G777 (20 pmol)
(0,5x13=)	6,5 µl de Taq ADN polymérase ( 5u/µl)

---

(45x13=) 585 µl total ( pour dix échantillons 50 µl )

2. Placer 45 µl du mélange dans chacun des trois tubes de 500 µl

- *Installer toutes les réactions PCR sur glace*
- *Etiqueter tous les tubes sur le coté avant PCR et vérifiez l'étiquette avant PCR !*

Mettre une goutte d'huile sous la hotte

Ajouter 5 µl d'ADN de cellules infectées ou 5 µl d'H<sub>2</sub>O (contrôle négatif) à chaque tube.

<u>Exemple :</u>	<u>Tube numéro</u>	<u>Echantillon</u>
	<i>De 1 à 10</i>	<i>Inconnu (Ux)</i>
	<i>12</i>	<i>pNL4-3(contrôle positif)</i>
	<i>13</i>	<i>H<sub>2</sub>O(contrôle négatif)</i>

3. Placer les tubes de réactions sur immédiatement dans le thermocycleur chauffé (94°C) (pour prévenir un mauvais amorçage entraînant des artefacts).

#### 4. Conditions d'amplification :

Nombre de cycles	Programme du cycle		Commentaires
	Temps	Température	
1	2 min	94°C	Dénaturation initiale
35	15 sec	94°C	Dénaturation
	30 sec	55°C	Hybridation / Première ronde PCR
	60 sec	72°C	Extension
1	7 min	72°C	Etape d'extension supplémentaire
1	Indéfini	4°C	

5. A la fin, stocker les échantillons à  $-20^{\circ}\text{C}$  ou poursuivez la deuxième ronde PCR.

#### ➤ Deuxième ronde d'inconnus PCR

Pour cette étape on prépare séparément deux mastermix *env* et *gag*

- Deuxième ronde PCR *gag* (Gag 2)

Les amorces *gag* du 2<sup>ème</sup> round

**H1Gag1584** 5'-AAAGATGGAGGATAATCCTGGG (1123-1141)

**g17** 5'-TCCACATTTCCAACAGCCCTTTTT (1566-1589)

1. Préparer un « mastermix » pour la **deuxième ronde d'amplification** (n=11) :

2. 11 inconnus + 1 contrôle positif (pNL4-3) + 1 contrôle négatif (de la première ronde) et 1 contrôle négatif (H<sub>2</sub>O ; pour la deuxième ronde).

Le 11<sup>ème</sup> échantillon constitue le contrôle négatif du premier round

- *Noter qu'un mélange est prévu pour 14 échantillons pour tenir compte des pertes pendant le pipetage.*
- *Conserver toutes les solutions sur glace, excepté Taq ADN polymérase qui doit être conservé à - 20°C.*

Mélanger en respectant l'ordre suivant :

(74x14=)	1036 µl d'H <sub>2</sub> O
(10x14=)	140 µl de 10x tampon de PCR
(10x14=)	140 µl de MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
(1x14=)	14 µl de dNTP mix (20 mM)
(1x14=)	14 µl de H1 Gag 1584 (10 pmol/µl)
(1x14=)	14 µl g17 (10 pmol/µl)
(1x14=)	14 µl de Taq ADN polymerase (5 u/µl)

---

(98x14=) 1372 µl total (pour sept réactions 100 µl)

3. Placer 98 µl du mélange dans chacun des sept tubes de 500 µl

- *Installer toutes les réactions PCR sur glace.*
- *Étiquetez tous les tubes sur le côté avant PCR et vérifiez que l'étiquette avant PCR !*

Mettre une goutte d'huile sous la hotte

4. Ajouter 2 µl de la réaction de la première ronde aux tubes marqués correspondants.

<i>Exemple : tube numéro</i>	<i>Echantillon</i>
<i>1 à 10</i>	<i>2 µl première ronde de l'inconnu</i>
<i>11</i>	<i>2 µl première ronde de pNL4-3 (contrôle positif)</i>
<i>12</i>	<i>2 µl première ronde de contrôle négatif (H<sub>2</sub>O)</i>
<i>13</i>	<i>2 µl H<sub>2</sub>O (contrôle négatif 2<sup>e</sup> ronde)</i>

5. Placer les tubes de réactions sur la glace immédiatement dans le thermocycleur chauffé (94°C) (pour prévenir un mauvais amorçage entraînant des artefacts).

6. Conditions d'amplification :

Nombre de cycles	Programme de cycle		Commentaires
	temps	température	
1	2 min	94°C	Dénaturation initiale
35	30 sec	94°C	Dénaturation
	30 sec	50°C	Hybridation
	60 sec	72°C	Extension
1	7 min	72°C	Etape d'extension supplémentaire
1	indéfini	4°C	



2. Placer 98  $\mu$ l du mélange dans chacun des 13 tubes

➤ *Installez toutes les réactions sur glace .*

➤ *Numérotez tous les tubes*

3. Ajouter 2  $\mu$ l de la réaction de la première ronde aux tubes marqués correspondants.

4. placer tous les tubes sur glace immédiatement dans le thermocycleur chauffé (94°C).

5. Conditions d'amplification :

Nombre de cycles	Programme de cycles		Commentaires
	temps	Température	
1	4 min	94°C	Dénaturation
	30 sec	55°C	
	1 min	72°C	
38	15 sec	94°C	Dénaturation
	30 sec	55°C	Hybridation
	1 min	72°C	Extension
1	15 sec	94°C	Etape d'extension supplémentaire
	30 sec	55°C	
	7 min	72°C	
1	Indéfini	4°C	

### 4.2.3. Révélation des produits d'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose 1%

#### ❖ Matériels et réactifs

- Appareil à électrophorèse horizontale
- Four à micro-ondes
- Embouts
- Erlenmeyer
- Générateur
- Balance
- Spatule
- Papier Aluminium
- Papier Saran
- Cupule de pesée
- H<sub>2</sub>O distillée
- Eprouvette
- Parafilm
- Agarose
- Tris
- EDTA
- Acide borique
- Bromure d'éthidium
- Bleu de charge
- Chronomètre

**❖ Préparation du gel**

- Peser 0,5 g d'agarose
- Mettre la poudre d'agarose avec 50 ml de tampon TBE 1X dans un erlenmeyer (16,20g de Tris 2,7 g d'acide Borique 0,95 g d'EDTA pour un litre)
- Mélanger et mettre au four à micro-ondes pendant 2 min
- Sortir l'erlenmeyer du four et ajouter 5 µl de BET(bromure d'éthidium) à 10 mg/ml
- Refroidir le gel jusqu'à 45-50 °C
- Couler le gel dans la cuve horizontale
- Mettre les peignes
- Attendre le temps nécessaire pour la solidification environ 1 heure.

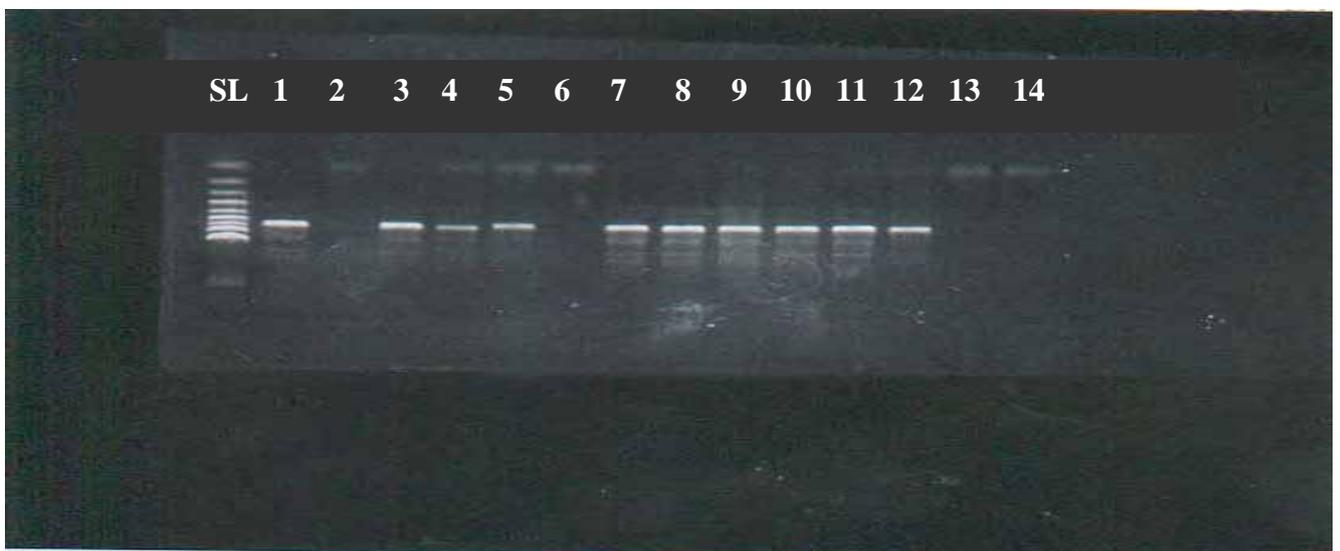
**❖ Migration**

- Retirer les peignes et les cales de la cuve
- Remplir le tampon TBE
- Charger les puits avec 8 µl (3 µl de bleu + 5 µl de produit de PCR) pour tous les échantillons et le témoin H<sub>2</sub>O
- Charger un puit extrême avec le marqueur M4
- Fermer la cuve
- Relier la cuve au générateur (ne pas se tromper de connections)
- Régler le générateur à 100-150 volts pendant 20 min
- Arrêter la migration

**❖ Révélation**

- Enlever le gel (l'emballer le dans du papier saran) et aller dans la chambre noire
- Visualiser le résultat sur la table UV à 100%
- Faire la photo avec l'appareil polaroid réglé à 5,6 :1/2

**Une bande à 700 pb est recherchée.**



**Figure N° 13 : Photo d'un gel d'agarose prise sur table UV avec le Polaroid**

**SL : Marqueur de poids moléculaire (Smart L)**

**Piste 1, 3, 4, 5, 7-12 : taille et poids moléculaire de l'ADN convenable pour HMA**

**Piste 2, 6, 13 : Absence d'amplification**

**Piste 14 : Absence d'amplification (contrôle négatif) ;signe de non contamination de l'eau utilisée pour la PCR.**

## 5. Heteroduplex Mobility Assay

### 5.1. Matériel et réactifs

- Appareil à électrophorèse verticale
- Générateur
- Plaques en verres rectangulaires de taille différentes dont deux en U
- Espaceurs latérales en plastique
- Pinces C.S.B.
- Peigne
- Acrylamides
- Tampon TBE 10x HMA
- H<sub>2</sub>O distillée
- APS 10%
- Temed
- Eprouvette de 100ml, 1000ml
- Bécher
- Tubes eppendorfs 1,5ml
- Pipette graduée de 1 ml, 5 ml, 10 ml
- Micropipette de 10 $\mu$ l, 200 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l
- Embouts pour ces micropipettes
- Verre à pied
- Pipette-aide
- Papier kimwips
- Bain marie

- Bac
- Glace pilée
- Chronomètre
- Congélateur
- Produit PCR 2<sup>eme</sup> round des échantillons
- Produit PCR 2eme round de la souche de référence connue
- Tampon d'annealing 10X
- Bleu charge
  - 40% de saccharose
  - 0,2% de bleu de bromophénol
  - 0,2% de Xylene Cyanole FF
- Bromure d'éthidium
  - 50 µl de BET à 10 mg/ml pour 500 ml

### **Préparation des réactifs**

*Solution de stock TBE 10X :*

890 mM de tris base.....108g

890 mM d'acide borique..... 55g

20 mM d'EDTA ..... 7,44g

Ajoutez de l'eau distillée jusqu'à 1 litre

*Heteroduplex annealing buffer 10X (tampon d'hybridation)*

20 mM d'EDTA .....0,74g

100 mM de tris.....1,21g

1000 mM de NaCl.....5,80g

Préparer pour 100 ml, filtrer, aliquoter et stocker à  $-20^{\circ}\text{C}$

*Persulfate d'ammonium 10% (APS)*

Préparer 1 g de persulfate d'ammonium anhydre pour 10 ml d'eau distillée

## 5.2. Préparation des gels de polyacrylamide

Les mélanges sont préparés dans un bécher de 250 ml et la composition des mélanges est différente selon le type de HMA réalisé.

### HMA *env*

	<u>1 gel</u>	<u>2 gels</u>
Acrylamide/ bis-acrylamide (40%)	6,25 ml	12,5 ml
TBE 10X	5 ml	10 ml
H <sub>2</sub> O	38,75 ml	77,5 ml
APS 10%	0,5 ml	1 ml
Temed	33 $\mu\text{l}$	66 $\mu\text{l}$

### HMA *gag*

- **Gels de polyacrylamide 5%/ 20% d'urée.**

50 ml d'un mélange sont préparés par gel :

6,3 ml d'acrylamide de stock 40%

5 ml de TBE 10X

10 g d'urée

Ajouter de l'eau jusqu'à un volume final inférieur à 50 ml

Placer la solution sur un agitateur magnétique jusqu'à dissolution

Compléter jusqu'à 50 ml exactement.

La polymérisation est initiée avec :

200 µl d'APS 25%

33 µl de TEMED

- **Gels de polyacrylamide 5%/30% d'urée.**

Pour ce cas on pèse 15 g d'urée par gel.

Noter que la polymérisation est inhibée par l'oxygène, donc ne pas agiter vigoureusement le mélange après adjonction de l'APS et du TEMED.

L'acrylamide non polymérisé est une neurotoxine cumulative dangereuse qui doit être manipulé avec précaution.

L'excédent du mélange du gel sera conservé dans le bécher en guise de témoins de polymérisation.

### **5.3. Préparation des plasmides de référence**

Les fragments de références sont amplifiés à partir de 10 ng de plasmide, en utilisant seulement les amorces de la 2<sup>ème</sup> ronde, tous les plasmides de référence ne contenant pas tous les sites des amorces de la 1<sup>ère</sup> ronde. ; La première ronde de PCR peut être omise et seule la PCR nichée doit être réalisée pour obtenir une quantité suffisante d'amplicon.

Notons que la PCR est pratiquée sur l'ADN de plasmide des gènes *env* et *gag*.

➤ ***Deuxième ronde de références PCR env et gag.***

Les références sont choisies en fonction des sous-types majoritaires qui circulent au NIGER.

### Les plasmides *env* sélectionnés

**A2, A3, B1, B2, C1, C2, D1, D3, G1, G2, G3.**

### Les plasmides *gag* sélectionnés

**A1, A2, A3, A4, B1, B2, E1 (AEcm240 1), E2 (AEcm240 2), E3 (AEcm240 3), E4 (AEcm240 4), I1 (AGibng 1), I2 (AGibng 2), I3 (AGibng 3), G1, G2, G3.**

#### 5.4. Préparation des plaques

- Nettoyer les plaques, spaceurs, pinces avec de l'alcool 70%
- Enrouler les joints en plastiques tout au tour de la petite plaque rectangulaire.
- Déposer les deux spaceurs latéraux
- Apposer la grande plaque en U.
- Mettre six pinces au niveau des trois extrémités (gauche, droite et bas)
- Présenter le peigne entre les deux plaques
- Poser verticalement les plaques assemblées sur la paille
- Enlever le peigne et couler le mélange de la préparation du gel de polyacrylamide entre les deux plaques
- Remettre les peignes et laisser polymériser environ 1 heure sur la paille
- Garder le reste du mélange dans le bécher comme témoin de polymérisation

En attendant préparer les échantillons

### 5.5. Préparation des échantillons pour le HMA

- ❖ Mettre dans les tubes Eppendorfs de 1,5 ml :
  - 4  $\mu$ l de produit PCR 2<sup>e</sup> ronde (100 à 200 ng d'ADN)
  - 4  $\mu$ l de la réaction PCR ronde du plasmide de référence
  - 0,9  $\mu$ l de tampon d'annealing 10X
  - faire un tube avec 8  $\mu$ l de réaction PCR à déterminer (l'échantillon sur lui-même) et 0,9  $\mu$ l de tampon 10X.
  
- ❖ faire chauffer les tubes 3 mns à 94°C pour générer des simples brins.
  
- ❖ les refroidir immédiatement dans de la glace « liquide » et les laisser 10 mn avant de les déposer sur le gel. Cela permettra la formation d'hétéroduplexes entre des séquences divergentes.

A ce stade les réactions peuvent être congelées à – 20°C.

### 5.6. Assemblage et électrophorèse

- Après polymérisation, les joints et les pinces sont enlevés.
- Placer la plaque dans l'appareil, la petite plaque étant en contact avec la cuve. Maintenir le gel en place à l'aide de clamps.
- Mettre un litre de TBE 1X dans le réservoir inférieur et 500 ml dans le réservoir supérieur dont les deux cotés sont constitués des deux plaques montés (cet appareil se monte avec deux plaques)
- S'assurer qu'aucune bulle n'est emprisonnée au fond du gel .
- Enlever verticalement le peigne en tirant doucement sur les deux cotés, à l'aide des deux mains.
- Apposer le couvercle de la cuve et attachez le générateur.

- Fair un « pré-run » à 250 volt pendant 10 à 15 minutes.
- Laver prudemment les puits à l'aide d'une seringue avec du TBE 1X
- Charger le gel

Dans le 1<sup>er</sup> puit  $U_0$  on dépose le marqueur (Find III)

Exemple :

$U_0$  ..... Marqueur  
 $U_1$  .....(A1 + échantillons)  
 $U_d$ .....(échantillon sur lui-même)

Le dépôt se fait par ordre alphabétique et numérique.

- Commencer la migration :
  - Gel sans urée (HMA) env : 250 volt pendant 3 heures.
  - Gel PAGE 5%/20% d'urée : 250 V pendant 2h30 mn.
  - Gel PAGE 5%/30% d'urée : 250 V pendant 3h.
- A la fin de l'électrophorèse, éteindre et déconnecter l'appareil, et déposer la plaque sur une serviette, utiliser le spaceur pour séparer délicatement les deux plaques.
- Transférer la plaque portant le gel dans un bain de BET (50ml de BET pour 500 ml d'eau)
- L'ADN est visualisé par illumination UV, et une photo est prise.

## 1. la population étudiée

Un échantillon a été constitué à partir de 118 patients repartis entre quelques structures sanitaires de la communauté urbaine de Niamey et recrutés sur la base de leur séropositivité. Sur les 118 patients, 104 sont positifs au VIH-1, 11 sont co-infectés par les VIH-1 et VIH-2, un patient est positif au VIH-2 et pour deux patients, le réactif de confirmation utilisé (Immunocoumb) n'a pas distingué avec précision le type viral (dans ce cas le dépistage sera repris dans trois mois).

Seuls les 104 patients infectés par le VIH-1 sont concernés par notre étude.

Les renseignements sur la population étudiée sont exploités sous forme de tableau et de figure.

### 1. 1. Répartition par structure sanitaire

**Tableau N° IV : Répartition par structure sanitaire**

<b>Structure sanitaire</b>	<b>HNN</b>	<b>CHU/lamordé</b>	<b>CHA/FNISS</b>	<b>ONG espoir</b>	<b>Total</b>
<b>Patients</b>	87	04	10	03	<b>104</b>

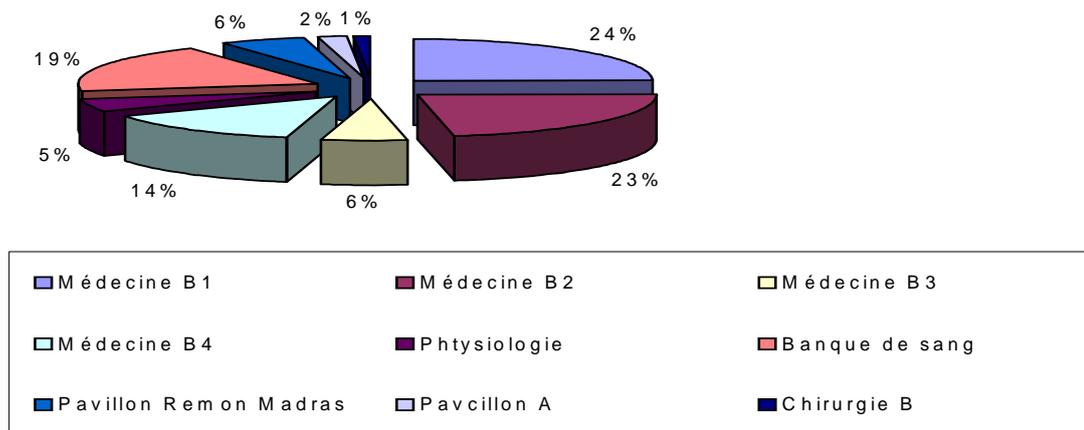
L'hôpital national de Niamey regroupe à lui seul 83.65 % des patients recrutés.

Ceci est dû au fait que le dépistage est réalisé à l'HNN et les malades sont le plus souvent hospitalisés en attendant leur résultat.

## 1.2. Répartition des patients par services hospitaliers

La plupart des malades (67 sur les 104) se retrouve dans les services de médecine interne de l'Hôpital (Méd B1, Méd B2, Méd B3, Méd B4 et pavillon Remon Madras) soit 64.42 %, un nombre non négligeable de donneurs de sang sont recrutés, (14 sur les 104) soit environ 13.46% des malades.

En phtysiologie, 04 patients présentant des signes de tuberculose pulmonaire ont été recrutés.



**Figure N° 14 : Répartition des patients par services hospitaliers**

### 1.3. Répartition des patients par tranches d'âge

Dans notre population, il y'a beaucoup plus de jeunes que de personnes âgées, Néanmoins toutes les classes d'âge sont représentées. Nous ne disposons pas de certains renseignements concernant les donneurs de la banque de sang à cause de l'anonymat conservé pendant le don.

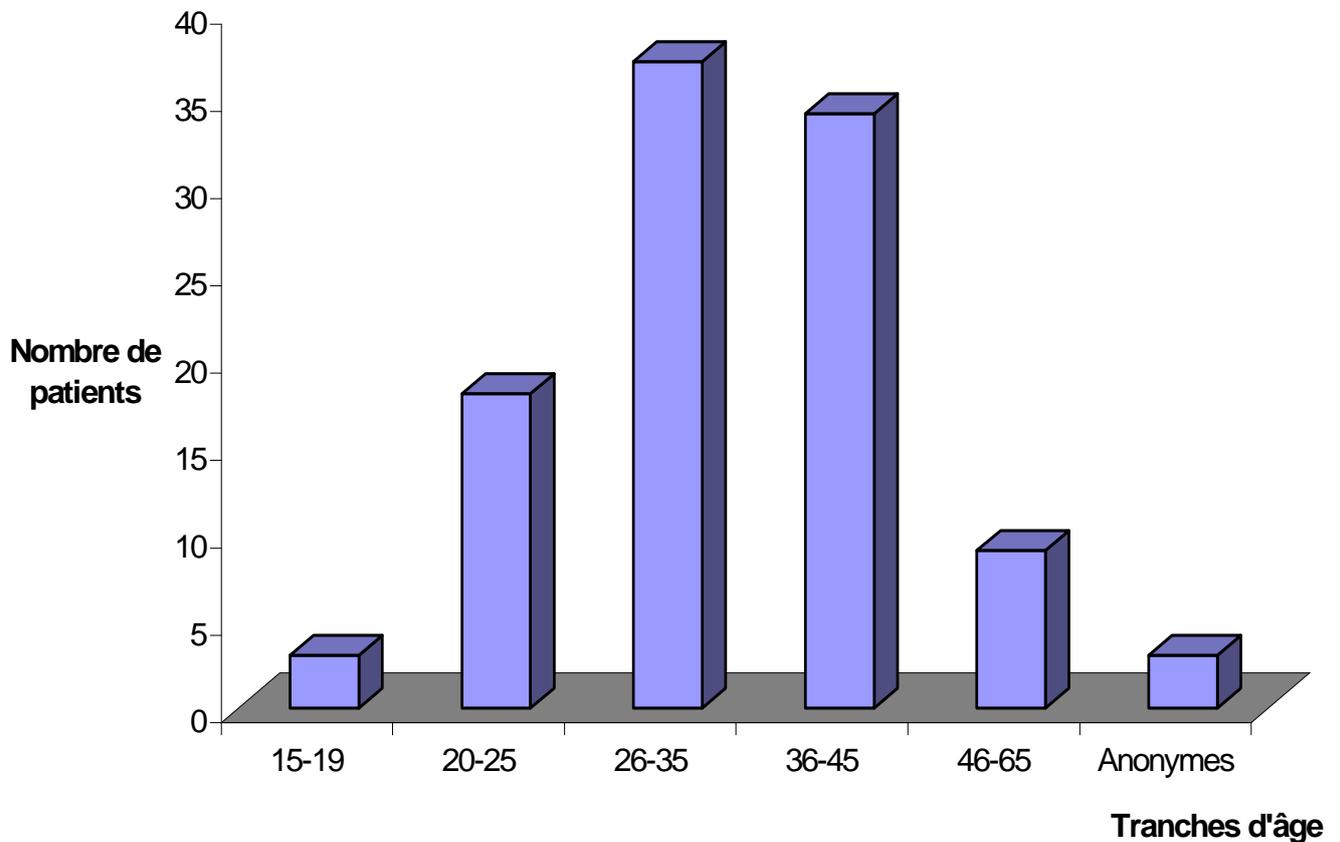


Figure N° 15 : Répartition des patients par tranches d'âge

#### 1.4. Répartition des patients par Nationalité

Quatre étrangers de l'Afrique de l'Ouest et du centre sont concernés par notre étude, mais la majorité des malades sont des nigériens avec les pourcentages suivants :

Niger : 87.5

Burkina Faso : 1.9

Cameroun : 0.96

Togo: 0.96

Pour 9 patients de la banque de sang, nous n'avons pas de précision sur la nationalité à cause de l'anonymat conserve au cours du don.

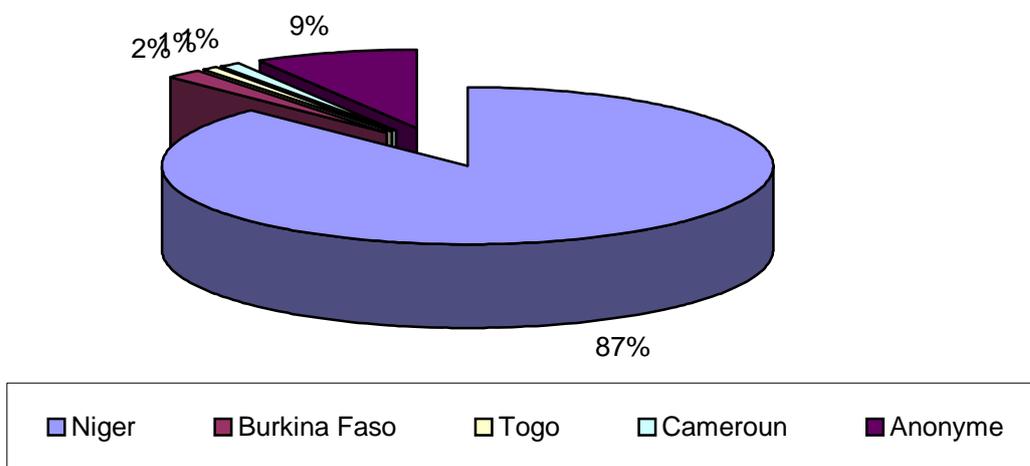


Figure N° 16 : Répartition par Nationalité

### 1.5. Motifs de la sérologie HIV

Tableau N° V : Motifs de la sérologie HIV

Motif	Suspicion clinique	Conjoint séropositif	Anonyme
Effectif	74	01	29

Le dépistage pour 74 sujets est motivé par la présence de signes cliniques, mais la séropositivité chez 27.8 % des patients est découverte de manière fortuite.

## 2. Les résultats de la PCR

### 2.1. Le Multiplex DNA PCR

Cette technique est caractérisée sur l'utilisation simultanée des deux types d'amorces env et gag à la première ronde d'amplification.

**Tableau N° VI : Multiplex DNA PCR env**

Résultat	Positif	Négatif	Faiblement positif
Nombre d'échantillons (Total : 104)	44	56	04

Sur les 104 échantillons positifs au VIH-1, seulement 44 ont été correctement amplifiés avec un rendement de 0.42. Les échantillons négatifs et faiblement positifs seront amplifiés par Simplex DNA PCR utilisant exclusivement des amorces *env*.

### 2.2. Le simplex DNA PCR env

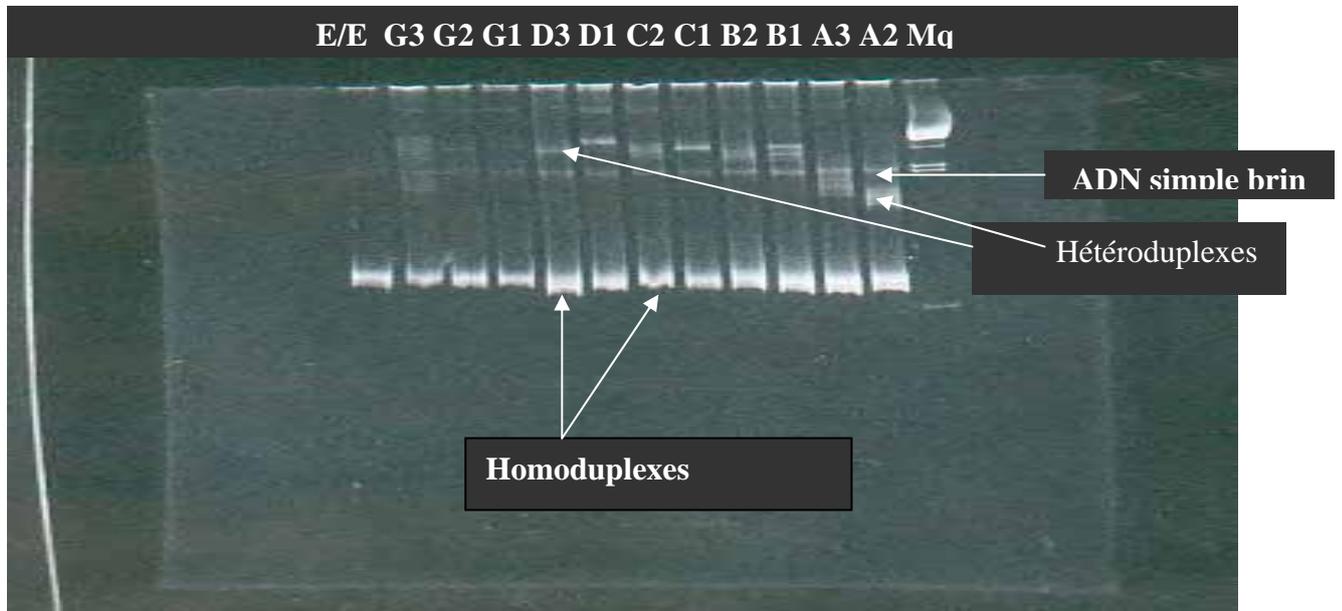
**Tableau N° VII : Simplex DNA PCR env**

Résultat	Positif	Négatif
Nombre d'échantillons (Total : 60)	10	50



### 3. Résultats des HMA

#### 3.1. HMA *env*



**Figure N° 17 : Photo d'un gel de polyacrylamide sur table UV prise avec l'appareil polaroid.( sous-type A)**

De la droite vers la gauche nous avons :

Mq : Le marqueur de poids moléculaire

A2 : Ce puit contient les duplexes formés entre l'échantillon inconnu et le plasmide de référence représentant le sous-type A.

G3 : le puit G3 contient les duplexes formés par l'échantillon et le plasmide de référence représentant le sous-type G3.

E/E : Ce puit ne contient que l'échantillon lui même et permet de faire une interprétation comparative avec les autres puits.

L'exemple ci-dessus est un **sous-type A** car les hétéroduplexes A2 et A3 correspondent aux migrations les plus rapides.

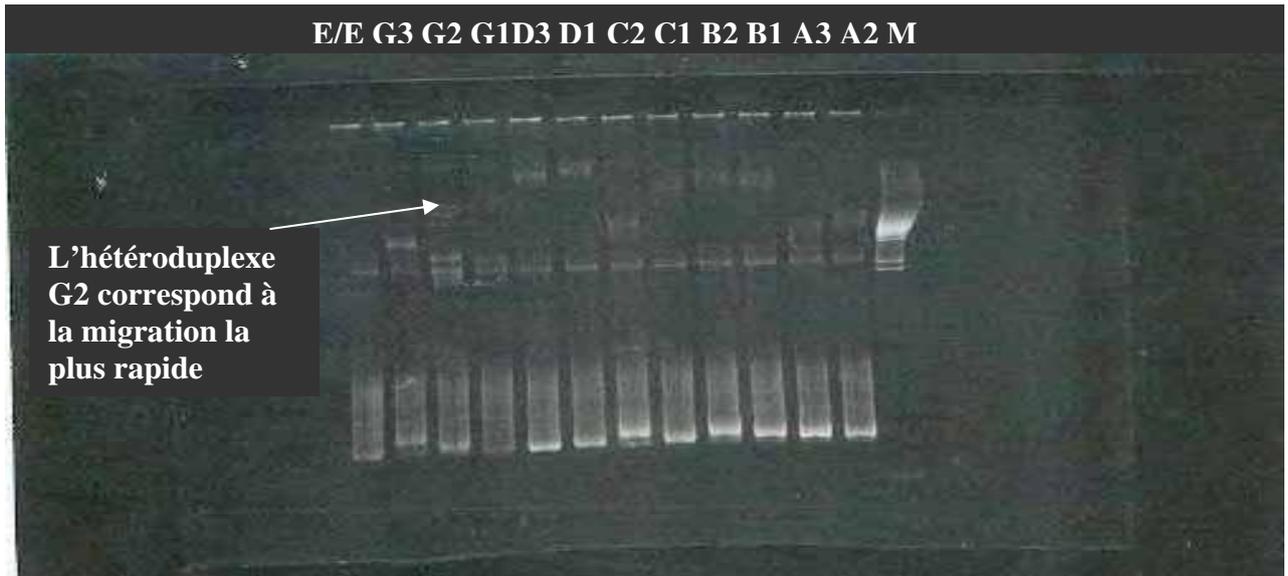


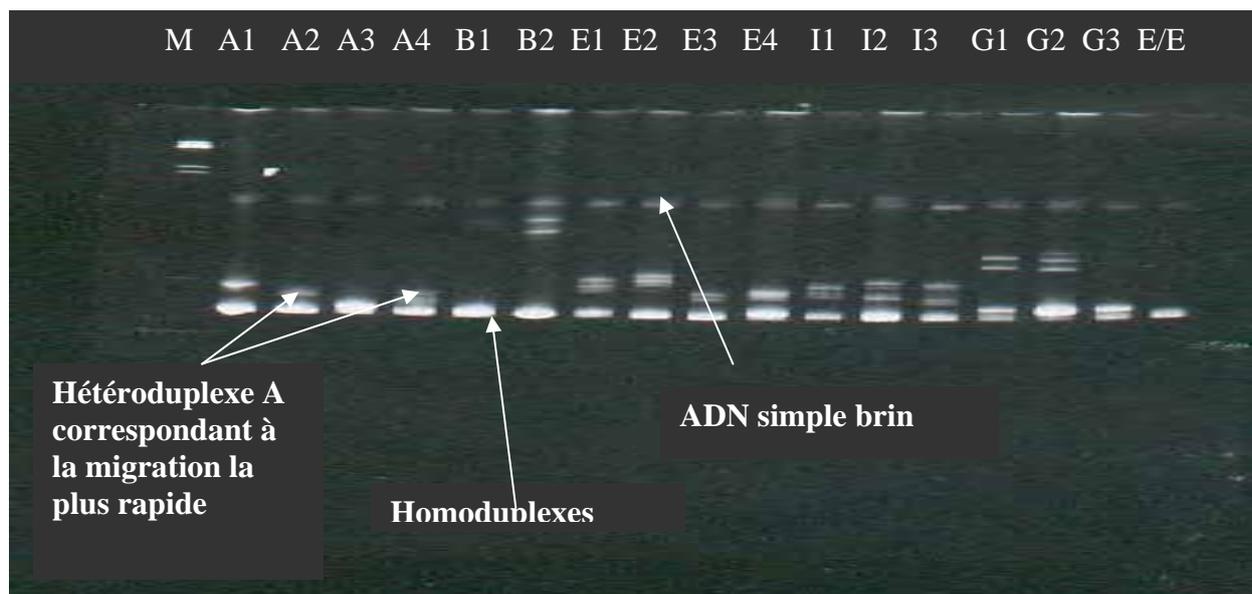
Figure N° 18 : photo d'un gel de polyacrylamide sur table UV prise avec le polaroid (sous-type G)

Tableau N° IX : HMA *env*

Sous-type viral	A	B	C	D	G	Indéterminé
Nombre d'échantillons	47	00	00	00	05	02

Sur les 54 échantillons caractérisés au HMA *env*, 47 sont du sous-type A, 05 du sous-type G et 02 sont indéterminés. Aucun des sous-types B, C, D, n'a été caractérisé dans notre population d'étude.

### 3.2. Résultats HMA *gag*



**Figure N° 19 : Photo d'un gel de polyacrylamide 5%PAGE/ 20% Urée sur table UV représentant le sous-type A**

Pour le HMA *gag* on utilise un gel dénaturant (Urée), il n'y a pas de différence de dispositions des puits avec le HMA *env*, seulement de nouveaux plasmides sont utilisés pour identifier les formes recombinées CRF01\_AE (E) et le CRF02\_AG représentés respectivement par le E et le I.

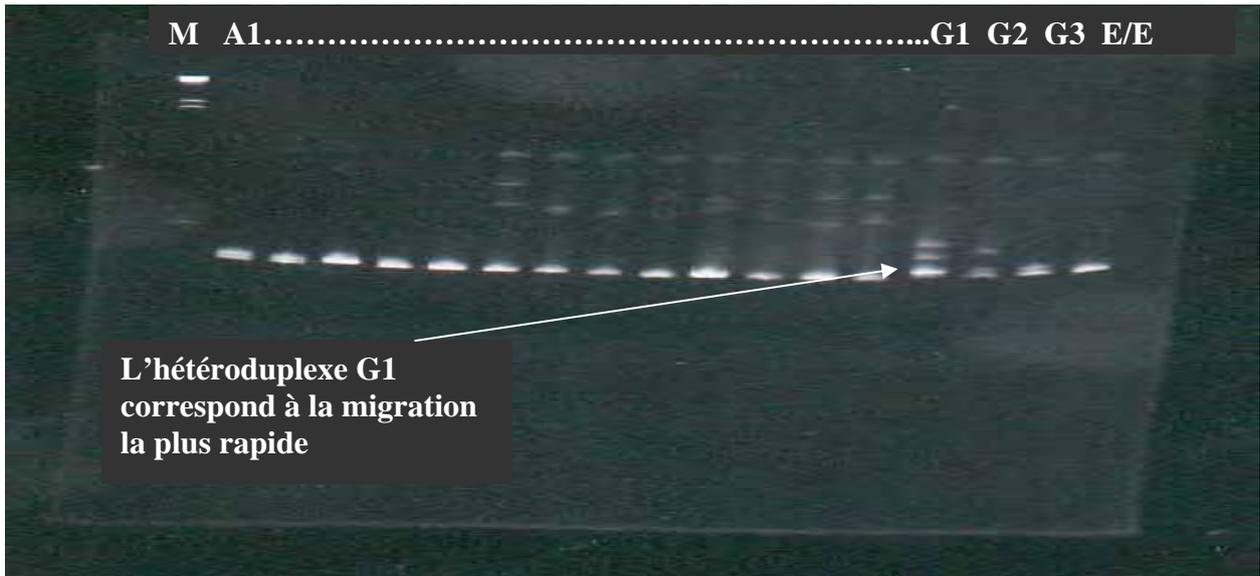
M : représente le marqueur qui est le phage III

A1 : Ce puit contient le plasmide A et l'échantillon inconnu

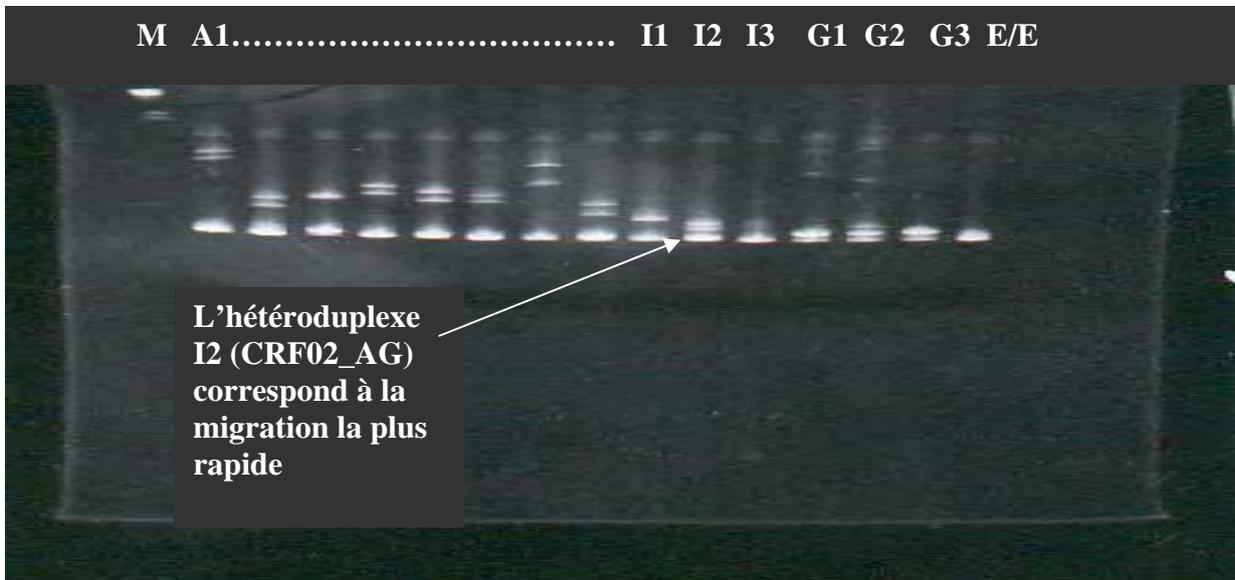
E1 : Ce puit contient le plasmide représentant le CRF01\_AE et l'échantillon inconnu

I1 : Ce puit contient le plasmide représentant le CRF02\_AG et l'échantillon inconnu

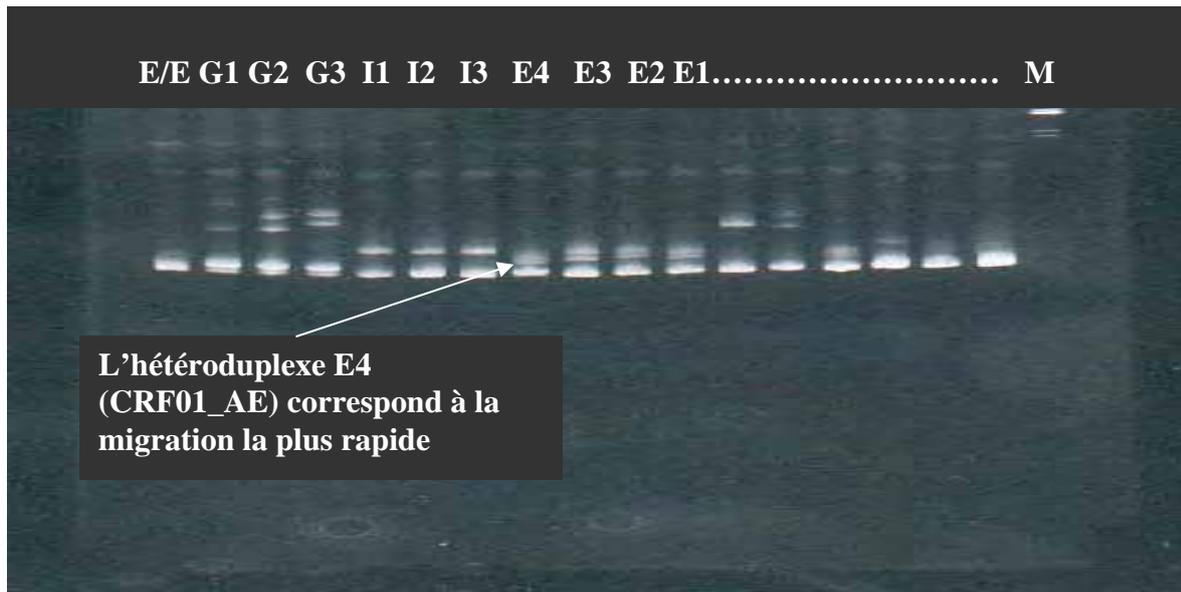
E/E : Ce puit Contient l'échantillon uniquement



**Figure N° 20 : Photo d'un gel de polyacrylamide 5% PAGE/ 20% Urée sur table UV prise par le Polaroid représentant le sous-type G**



**Figure N° 21 : Photo d'un gel de polyacrylamide 5% PAGE/ 20% Urée sur table UV prise par le Polaroid représentant le CRF02\_AG.**



**Figure N° 22 : Photo d'un gel de polyacrylamide 5% PAGE/ 30% Urée sur table UV prise par le Polaroid représentant le CRF01\_AE.**



**Figure N° 23 : Photo d'un gel de polyacrylamide 5% PAGE/ 20% Urée sur table UV prise par le Polaroid représentant une forme indéterminée.**

**Tableau X : HMA *gag***

<b>Sous-types</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>CRF02_AG</b>	<b>CRF01_AE</b>	<b>indéterminé</b>
<b>Echantillons (30)</b>	<b>03</b>	<b>02</b>	<b>22</b>	<b>02</b>	<b>01</b>

La caractérisation des souches au HMA *gag* nous a permis de notifier la présence majoritaire de la forme recombinée CRF02\_AG à un pourcentage de 73.3, trois échantillons sur les 30 sont du sous-type A, 2 du sous-type G et du CRF01\_AE et un indéterminé.

**Tableau N° XI : Tableau récapitulatif des résultats de HMA *env/gag***

	Sous-type			Sous-type	
	HMA <i>env</i>	HMA <i>gag</i>		HMA <i>env</i>	HMA <i>gag</i>
<b>NIG1</b>	A	A	<b>NIG28</b>	A	I
<b>NIG2</b>	A	A	<b>NIG29</b>	A	I
<b>NIG3</b>	G	A	<b>NIG30</b>	A	E
<b>NIG4</b>	G	G	<b>NIG31</b>	A	N
<b>NIG5</b>	G	G	<b>NIG32</b>	A	N
<b>NIG6</b>	A	E	<b>NIG33</b>	A	N
<b>NIG7</b>	A	E	<b>NIG34</b>	G	N
<b>NIG8</b>	A	IND	<b>NIG35</b>	G	N
<b>NIG9</b>	A	I	<b>NIG36</b>	A	N
<b>NIG10</b>	A	I	<b>NIG37</b>	A	N
<b>NIG11</b>	A	I	<b>NIG38</b>	A	N
<b>NIG12</b>	A	I	<b>NIG39</b>	A	N
<b>NIG13</b>	A	I	<b>NIG40</b>	A	N
<b>NIG14</b>	A	I	<b>NIG41</b>	A	N
<b>NIG15</b>	A	I	<b>NIG42</b>	A	N
<b>NIG16</b>	A	I	<b>NIG43</b>	A	N
<b>NIG17</b>	A	I	<b>NIG44</b>	A	N
<b>NIG18</b>	A	I	<b>NIG45</b>	A	N
<b>NIG19</b>	A	I	<b>NIG46</b>	A	N
<b>NIG20</b>	A	I	<b>NIG47</b>	A	N
<b>NIG21</b>	A	I	<b>NIG48</b>	A	N
<b>NIG22</b>	A	I	<b>NIG49</b>	A	N
<b>NIG23</b>	A	I	<b>NIG50</b>	A	N
<b>NIG24</b>	A	I	<b>NIG51</b>	A	N
<b>NIG25</b>	A	I	<b>NIG52</b>	A	N
<b>NIG26</b>	A	I	<b>NIG53</b>	IND	N
<b>NIG27</b>	A	I	<b>NIG54</b>	IND	N

**A : Sous-type A    G : Sous-type G****E : CRF01\_AE****I :CRF02\_AG    IND : Indéterminé****N :Non caractérisé**

## 1. La méthodologie

L'objectif de notre travail a été d'évaluer le Multiplex DNA PCR basé sur l'amplification simultanée des fragments d'ADN au niveau des régions *env* et *gag* et de caractériser les différents sous-types de VIH-1 du groupe M et les formes recombinantes circulant au Niger par Heteroduplex Mobility Assay.

Pour cela de Février à Mai 2002, 118 patients ont été recrutés sur la base de leur séropositivité au VIH dont 104 au VIH-1.

La caractérisation par la technique du HMA au niveau de l'enveloppe n'a pu être réalisée que pour 54 échantillons parmi les 104 positifs VIH-1.

A partir de l'ADN proviral extrait des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) de ces patients, une PCR multiplex utilisant simultanément à la première ronde des amorces *env* (ED5-ED12) et *gag* (H1G777-H1P202) a été réalisée : c'est le multiplex DNA PCR.

Les deux deuxième ronde de PCR sont séparées :

- au niveau du gène *env*, on aboutit à l'amplification d'un fragment de 700 paires de bases couvrant la région V3-V5 de la gp 120.
- au niveau de *gag*, on aboutit à un fragment de 460 paire de bases couvrant la p24 à partir de l'acide aminé 132 jusqu'à l'acide aminé 40 de la p7.

Les régions caractérisées peuvent varier tout le long du génome ; c'est ainsi que certains auteurs ont amplifiés d'autre régions comme la LTR, d'autres régions du gène *gag*, le gène *pol...*[33].

Le HMA est largement utilisé dans les pays en développement pour caractériser les souches virales au niveau des gènes *gag* et de l'enveloppe ; cependant sa réalisation n'est pas toujours très facile.

L'interprétation est conditionnée par :

- Une bonne formation des hétéroduplexes qui passe par un respect scrupuleux du temps de dénaturation et de la température du bain de refroidissement

- Une migration uniforme de ces hétéroduplexes dépendant de la température de la salle de manipulation.

## 2. La population étudiée

Notre population d'étude n'a été sélectionnée que sur la base de la séropositivité des patients au VIH-1, contrairement aux études réalisées dans d'autres pays africains comme en Gambie [25], ou au Togo [17] où en plus de l'état d'immunodépression des patients, la numération des lymphocytes TCD4 a été considérée.

Le défaut de détermination du taux de CD4 dans notre population d'étude (marqueur non encore disponible à Niamey), pourrait expliquer en partie le faible pourcentage de souches amplifiées à la PCR.

## 3. Analyse des résultats

Le Multiplex DNA PCR est effectué pour les 104 patients a permis d'amplifier 54 fragments dans le gène *env* et 68 fragment dans le gène, ce qui correspond à un rendement de 0.42 pour le gène *env* et 0.65 pour le gène *gag*. Nos rendements sont inférieurs à ceux obtenus en Gambie par Fatim Cham et coll. en 2000 qui ont enregistré un taux de 0.93. Les raisons de ce faible rendement peuvent être intrinsèques aux prélèvements mais aussi extrinsèques ; il peut s'agir d'inhibiteurs de PCR contenus dans les prélèvements, d'ADN de VIH-1 non amplifiables par les amorces utilisés, charge provirale faible ou de la plus grande variabilité retrouvée au niveau de l'enveloppe.

Ce faible rendement pour l'amplification du gène de l'enveloppe a été retrouvé même en passant les échantillons sur PCR simplex.

Sur les 54 échantillons passés au HMA *env*, la majorité (47) est du sous-type A soit 87.03 % et 05 sont du sous-type G (9.2 %) et 02 sont indéterminés (3.7 %).

Pour 09 échantillons, nous avons retrouvé une migration simultanée des hétéroduplexes pour les sous-types A et G, évoquant probablement un phénomène de co-infection par deux sous-types différents du même groupe rapporté par Arteinsten et coll [2, 91, 39]. Le même phénomène a été noté à Lomé par *Davies et coll.* en 1999 sur l'échantillon T52. Des cas de co-infection entre des virus très divergents comme les VIH-1 et VIH-2 ont été rapportés par Peeters et coll en 1992 ; d'autres études ont fait cas de co-infection entre le VIH-1 groupe M et le VIH-1 groupe O au Bénin [35].

La diversité génétique au niveau du gène *env* par le HMA montre une prédominance des sous-types A (87.03 %) et G (9.2 %) ; cette prédominance du sous-type A est retrouvée dans d'autres pays de la sous-région comme le Sénégal avec un pourcentage de 84.6% [85], le Togo (80%) [17], en Côte d'Ivoire (95,3 %) [24]. Le génotype G a été également identifié au Gabon [40,18], en Centrafrique [58], en République Démocratique du Congo [72], au Nigeria [1]. Les autres sous-types du groupe M ( B, C, D, F, H), n'ont pas été identifiés dans notre population d'étude.

Dans le but d'avoir des estimations préliminaires sur la fréquence des virus recombinants au Niger, nous avons utilisé simultanément le HMA *gag* de celui de l'enveloppe.

Sur les 68 échantillons amplifiés au Multiplex DNA PCR *gag*, 30 déjà caractérisés dans le gène *env* sont retenus pour le HMA *gag*.

L'analyse des résultats des HMA *env* et *gag* a permis de confirmer la prédominance de la forme recombinée CRF02\_AG au Niger [77]. Cette souche initialement appelé IBNG est caractérisé dans 22 échantillons sur les 30 soit 73.33 %, suivi du sous-type A pur caractérisé dans 03 échantillons, 02 échantillons sont du sous-type G et la même proportion a été retrouvée pour la forme recombinée CRF01\_AE. Notons que l'isolat NIG7 s'est avéré indéterminé au HMA *gag* à deux reprises.

Il est important de souligner la discordance remarquée chez l'isolat NIG3, qui caractérisé sous-type G dans le gène *env* et A dans le gène *gag*.

Les mêmes proportions prédominantes du CRF02\_AG ont été notées en Gambie, 19 des 28 échantillons de Fatim soit 68%, au Sénégal (84.3%), au Nigéria (70.6%), Cameroun (61.5%), au Gabon 54.3%. En effet la majorité des sous-types A du VIH-1 caractérisés dans les gènes *env* et *gag* des virus circulants dans l'Ouest et le centre Ouest de l'Afrique sont similaires à la forme recombinante IBNG [55]. Par contre l'identification des formes recombinées inter-sous-types du VIH-1 par HMA *env/gag* en Afrique du Sud donne des résultats prédominants pour le sous-type C avec un pourcentage de 97% dans la population hétérosexuelle infectée [33].

Il faut noter qu'il n'est pas possible de différencier les sous-types A, les CRF01\_AE et les CRF02\_AG par le HMA *env*, leur caractérisation se fait par HMA *gag* sur gel de polyacrylamide dénaturant à 20 et surtout à 30% d'urée.

La combinaison des HMA *env* et *gag* est une technique de screening rapide permettant de caractériser des formes recombinantes ou des co-infections, néanmoins l'analyse isolée de ces deux régions fait que la fréquence de ces formes est réellement sous estimée d'où la nécessité de confirmer les résultats du HMA des isolats par séquençage des génomes partiels et complets suivi d'analyses phylogénétiques.

La variabilité génétique est une caractéristique majeure du virus de l'immunodéficience humaine et surtout du VIH-1. La plus grande diversité est observée en Afrique où circulent tous les sous-types et groupes.

Les objectifs de notre travail reposent sur l'évaluation du Multiplex DNA PCR, l'identification des différents sous-types et des formes recombinantes circulant à Niamey au Niger par la technique d'Heteroduplex Mobility Assay.

Sur 118 prélèvements effectués chez des patients séropositifs, 104 infectés au VIH-1 ont subi la séparation lymphocytaire par gradient de Ficoll. Leur ADN proviral a été extrait et amplifié par PCR nichée : Multiplex DNA PCR utilisant à la première ronde deux couples d'amorces pour les gènes *env* et *gag*. Le produit d'amplification sert de matrice pour les deuxièmes rondes qui se font séparément. Les échantillons négatifs sont amplifiés à nouveau en utilisant une PCR nichée en simplex.

Le Multiplex DNA PCR est une méthode basée sur l'amplification de l'ADN double brin utilisant simultanément les amorces *env* et *gag* à la première ronde.

Le Multiplex DNA PCR a permis d'amplifier 44 fragments dans le gène *env* et 68 fragments dans le gène *gag*, ce qui correspond à un rendement de 0.42 pour le gène *env* et 0.65 pour le gène *gag*.

Le Simplex DNA PCR *env* réalisé a permis d'amplifier 10 autres échantillons.

L'Heteroduplex Mobility Assay (HMA) est une technique basée sur la différence de mobilité des hétéroduplexes formés entre les fragments d'ADN des virus inconnus et des plasmides de référence. Pour cela une électrophorèse verticale sur gel de polyacrylamide est effectuée à 250V pendant 3 heures. La révélation est faite à la lumière UV sur le gel préalablement coloré au bromure d'éthidium.

Sur les 54 échantillons passés au HMA *env*, la majorité (47) est du sous-type A soit 87.03 % et 05 sont du sous-type G (9.2 %) et 02 sont indéterminés (3.7 %).

Pour 09 échantillons, nous avons remarqué une migration simultanée des hétéroduplexes pour les sous-types A et G, évoquant probablement un phénomène de co-infection par deux sous-types différents du même groupe.

Le HMA *gag* dont le but est d'avoir des estimations préliminaires sur la fréquence des virus recombinants à Niamey a été effectué simultanément avec celui de l'enveloppe.

Sur les 68 échantillons amplifiés au Multiplex DNA PCR *gag*, 30 déjà caractérisés dans le gène *env* ont été retenus pour le HMA *gag*.

L'analyse des résultats des HMA *env* et *gag* a permis de confirmer la prédominance de la forme recombinée CRF02\_AG à Niamey avec un pourcentage de 73.3%. D'autres génotypes sont retrouvés dans notre population d'étude : il s'agit des sous-types purs A (10%), G (6.6%) et la forme recombinante circulante CRF01\_AE à un pourcentage de 6.6.

Le HMA est largement utilisé dans les pays en voie de développement pour identifier rapidement les sous-types viraux. Il est moins onéreux, cependant c'est une technique fastidieuse et il reste limité car au fur et à mesure que de nouvelles régions géographiques sont étudiées, les amorces d'amplification utilisées ne sont pas toujours suffisamment représentées et un nombre élevé d'échantillons reste indéterminé. Le HMA *gag* utilisé dans notre travail a été développé dans le but de distinguer surtout les sous-types A des CRF01\_AE et CRF02\_AG. Par ailleurs le nombre d'échantillon analysé en un temps court est faible et l'interprétation des résultats est souvent difficile.

D'après nos résultats, le profil de distribution des génotypes viraux au Niger est similaire à ceux retrouvés dans certains pays de la sous région avec une prédominance des sous-types A au niveau de gène *env* et plus précisément de la forme recombinante circulante CRF02\_AG. En effet 90% des isolats sont caractérisés sous-type A dans le gène *env* et l'analyse simultanée des HMA *env* et *gag* confirme la prédominance du CRF02\_AG. Le séquençage et l'analyse phylogénétique de certains isolats nigériens réalisés par Saidou Mamadou et collaborateurs en 1997 et 2000 ont donné le même profil de distribution des génotypes viraux.

L'étude des variants viraux VIH-1 au Niger illustre que la distribution des sous-types est un processus dynamique et imprévisible avec un nombre croissant de virus qui se recombine. dans les futures études d'épidémiologie moléculaire, il faudra inclure la surveillance

des sous-types purs et les formes recombinantes circulantes. Il est important d'étudier en détail l'impact de la recombinaison virale sur les propriétés du virus étant donné que la recombinaison peut entraîner des conséquences génétiques et biologiques importantes. Enfin, il faudra continuer à réfléchir sur la possibilité de simplifier les techniques adaptées à nos pays pour l'étude de grand nombre d'échantillons à des temps limités, afin d'établir des cartographies des génotypes propres à chaque pays leur permettant de prendre part à la dynamique mondiale de recherche vaccinale et thérapeutique.