

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

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

ANNEE 2003

N° 01



**DIVERSITE GENETIQUE DU VIH-1 AU NIGER : ETUDE DES
VARIANTS DES GROUPES M ET O**

THESE

DE

DOCTORAT ES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

(DIPLOME D'ETAT)

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT

le 09 Avril 2003 par

Saïdou MAMADOÛ

JURY

PRÉSIDENT :	M. Doudou BA	Professeur
MEMBRES :	M. Souleymane MBOUP	Professeur
	M. Eric DELAPORTE	Professeur
	M. François SIMON	Professeur
	Mme Aïssatou GAYE-DIALLO	Professeur
DIRECTEURS DE THÈSE :	M. Souleymane MBOUP	Professeur
	M. Eric DELAPORTE	Professeur

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

FACULTE DE MEDECINE DE PHARMACIE ET D'ODONTO - STOMATOLOGIE

DECANAT & DIRECTION

DOYEN

M Doudou

THIAM

PREMIER ASSESSEUR

M. Cheikh Saad Bouh

BOYE

DEUXIEME ASSESSEUR

M. Malick

SEMBENE

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

M. Assane

CISSE

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT PAR GRADE

ANNEE UNIVERSITAIRE 2002-2003

I. MEDECINE

PROFESSEURS TITULAIRES

M.	José Marie		AFOUTOU	Histologie-Embryologie
M.	Mamadou		BA	Pédiatrie
M.	Mamadou		BA	Urologie
M.	Serigne Abdou		BA	Cardiologie
M.	Fallou		CISSE	Physiologie
M.	Moussa Fafa		CISSE	Bactériologie-Virologie
M.	Abdarahmane		DIA	Anatomie-Chirurgie Générale
M.	Baye Assane		DIAGNE	Urologie
M.	Lamine		DIAKHATE	Hématologie
M.	Amadou Gallo		DIOP	Neurologie
* M.	EL Hadj Malick		DIOP	O-R-L
Mme	Thérèse MOREIRA		DIOP	Médecine Interne I
M.	Sémou		DIOUF	Cardiologie
M.	Souvasin		DIOUF	Orthopédie-Traumatologie
M.	Babacar		FALL	Chirurgie Générale
Mme	Sylvie	SECK	GASSAMA	Biophysique
M.	Oumar		GAYE	Parasitologie
M.	Momar		GUEYE	Psychiatrie
*M.	Serigne Maguèye		GUEYE	Urologie
M.	Abdoul Almamy		HANE	Pneumophtisiologie
M.	Abdoul		KANE	Cardiologie
M.	Nicolas		KUAKUVI	Pédiatrie
M.	Victorino		MENDES	Anatomie Pathologique
M.	Jean Charles		MOREAU	Gynécologie-Obstétrique
M.	Bassirou		NDIAYE	Dermatologie
M.	Ibrahima Pierre		NDIAYE	Neurologie
*M.	Madoune Robert		NDIAYE	Ophtalmologie
M.	Mouhammadou		NDIAYE	Chir Thoracique&Cardio-vasculaire
M.	Mouhammadou Mansour		NDIAYE	Neurologie
Mme	Mbayang	NIANG	NDIAYE	Physiologie
M.	Pape Amadou		NDIAYE	Ophtalmologie
*M.	Mamadou		NDOYE	Chirurgie Infantile
Mme	Bineta	KA	SALL	Anesthésie-Réanimation
M.	Mohamadou Guélaye		SALL	Pédiatrie
M.	Niama	DIOP	SALL	Biochimie Médicale
M.	Abibou		SAMB	Bactériologie-virologie
M.	Mamadou		SARR	Pédiatrie
§Mme	Awa Marie	COLL	SECK	Maladies Infectieuses
M.	Cheickna		SYLLA	Urologie
M.	Seydina Issa Laye		SEYE	Orthopédie-Traumatologie
M.	Abdourahmane		SOW	Maladies Infectieuses
M.	Housseyn Dembel		SOW	Pédiatrie
M.	Mamadou Lamine		SOW	Médecine Légale
M.	Moussa Lamine		SOW	Anatomie-Chirurgie Générale
M.	Pape Salif		SOW	Maladies Infectieuses
M.	Doudou		THIAM	Hématologie
*M.	Cheikh Tidiane		TOURE	Chirurgie Générale

* Associé

§ Détachement

M. Meissa	TOURE	Biochimie Médicale
M. Pape	TOURE	Cancérologie
M. Alassane	WADE	Ophthalmologie.

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

M. Moussa		BADIANE	Radiologie
M. Seydou Boubakar		BADIANE	Neurochirurgie
M. Mohamed Diawo		BAH	Gynécologie-Obstétrique
M. Jean Marie		DANGOU	Anatomie et Cytologie Patholog.
*M. Massar		DIAGNE	Neurologie
+M. Issakha		DIALLO	Santé Publique
M. Bernard Marcel		DIOP	Maladies Infectieuses
M. El Hadj Ibrahima		DIOP	Orthopédie-Traumatologie
M. Ibrahima Bara		DIOP	Cardiologie
M. Saïd Norou		DIOP	Médecine Interne II
M. Alassane		DIOUF	Gynécologie-Obstétrique
M. Boucar		DIOUF	Néphrologie
M. Raymond		DIOUF	O.R.L
M. Ibrahima		FALL	Chirurgie Pédiatrique
Mme.Mame Awa		FAYE	Maladies Infectieuses
M. Oumar		FAYE	Parasitologie
Mme Gisèle	WOTO	GAYE	Anatomie Pathologique
M. Lamune		GUEYE	Physiologie
*M. Mamadou Mourtalla		KA	Médecine Interne
M. Claude		MOREIRA	Pédiatrie
M. Abdoulaye		NDIAYE	Anatomie-Orthopédie-Traumatologie
M. Issa		NDIAYE	O.R.L
M. Alain Khassim		NDOYE	Urologie
M. El Hadji		NIANG	Radiologie
*M. Youssoupha		SAKHO	Neurochirurgie
M. Moustapha		SARR	Cardiologie
M. Birama		SECK	Pédopsychiatrie
M. EL Hassane		SIDIBE	Endocrinologie-Métabolisme Nutrition-Diabétologie
M. Ahmad Iyane		SOW	Bactériologie-Virologie
Mme.Haby	SIGNATE	SY	Pédiatrie
M. Mouhamadou Habib		SY	Orthopédie-Traumatologie
M. Omar		SYLLA	Psychiatrie

MAITRES-ASSISTANTS

Mme Aïssata	LY	BA	Radiologie
M. EL Hadj Amadou		BA	Ophthalmologie
Mme Mariama	GUEYE	BA	Gynécologie-Obstétrique
M. Momar Codé		BA	Neurochirurgie
M. Moussa		BA	Psychiatrie
M. Boubacar		CAMARA	Pédiatrie
M. El Hadj Souleymane		CAMARA	Orthopédie-Traumatologie
M. Cheikh Ahmed Tidiane		CISSE	Gynécologie-Obstétrique
Mme. Mariama Safiétou	KA	CISSE	Médecine Interne
M. André Vauvert		DANSOKHO	Orthopédie-Traumatologie
M. Ahmadou		DEM	Cancérologie
Mme Anta	TAL	DIA	Médecine Préventive
*M Ibrahima		DIAGNE	Pédiatrie

+ disponibilité

* Associé

M. Djibril		DIALLO	Gynécologie-Obstétrique
M. Saïdou		DIALLO	Rhumatologie
M. Alassane		DIATTA	Biochimie Médicale
*M. Mame Thierno		DIENG	Dermatologie
M. Yémou		DIENG	Parasitologie
M. Saliou		DIOP	Hématologie
Mme. Sokhna	BA	DIOP	Radiologie
Mme. Elisabeth		DIOUF	Anesthésie-Réanimation
Mme Fatou	SENE	DIOUF	Neurologie
M. Mamadou Lamine		DIOUF	Gastro-Entérologie
M. Saliou		DIOUF	Pédiatrie
Mme Mame Coumba	GAYE	FALL	Médecine Légale
M. Pape Ahmed		FALL	Urologie
M. Oumar		FAYE	Histologie-Embryologie
M. EL Hadj Fary		KA	Clinique Médicale/Néphrologie
M. Assane		KANE	Dermatologie
M. Oumar		KANE	Anesthésie-Réanimation
*M. Abdoul Aziz		KASSE	Cancérologie
Mme Ndèye Maïmouna	NDOUR	MBAYE	Médecine Interne
M. Mouhamadou		MBENGUE	Gastro-Entérologie
M. Mamadou		MBODJ	Biophysique
M. Philipe Marc		MOREIRA	Gynécologie
+Mme Coura	SEYE	NDIAYE	Ophthalmologie
M. Ousmane		NDIAYE	Pédiatrie
*M. Cheikh Tidiane		NDOUR	Maladies Infectieuses
M. Ndaraw		NDOYE	Neurochirurgie
M. Oumar		NDOYE	Biophysique
M. Abdou		NIANG	Néphrologie
Mme Suzanne Oumou		NIANG	Dermatologie
M. Abdoulaye		POUYE	Médecine Interne
Mme Paule Aïda	NDOYE	ROTH	Ophthalmologie
M. Abdoulaye		SAMB	Physiologie
Mme Anne Aurore		SANKALE	Chirurgie Générale
Mme Anna		SARR	Médecine Interne
M. Doudou		SARR	Psychiatrie
M. Ndéné Gaston		SARR	Biochimie Médicale
M. Amadou Makhtar		SECK	Psychiatrie
M. Gora		SECK	Physiologie
M. Moussa		SEYDI	Maladies Infectieuses
*M. Masserigne		SOUMARE	Maladies Infectieuses
Mme Hassanatou	TOURE	SOW	Biophysique
Mme Aïda		SYLLA	Psychiatrie
M. Abdourahmane		TALL	O.R.L.
M. Alé		HIAM	Neurologie
M. Mamadou Habib		THIAM	Psychiatrie
M. Issa		WONE	Médecine Préventive

ASSISTANTS

Mlle Agaïcha Tamolette	AIFIDJA	Radiologie
M. Abdoulaye	BA	Physiologie
M. Boubacar Samba	DANKOKO	Médecine Préventive
M. Abdoulaye Sèga	DIALLO	Histologie-Embryologie
Melle Fatou	DIALLO	Biochimie Médicale
M. Dialo	DIOP	Bactériologie-Virologie
M. Mamadou	DIOP	Anatomie-Cancérologie

* Associé

+ Disponibilité

M.	Moctar		DIOP	Histologie-Embryologie
Mme	Awa Oumar	TOURE	FALL	Hématologie
M.	EL Hadj Alioune		LO	Anatomie Organogenèse
M.	Ismaïla		MBAYE	Médecine du Travail
M	Papa		NDIAYE	Médecine Préventive
M.	Jean Marc Ndiaga		NDOYE	Anatomie
M.	Kamadore		TOURE	Médecine Préventive

CHEFS DE CLINIQUE-ASSISTANTS DES SERVICES UNIVERSITAIRES DES HOPITAUX

M	Mamadou Diarrah		BEYE	Anesthésie-Réanimation
M	Mamadou Lamine		CISSE	Gynécologie-Obstétrique
M.	Abdoulaye		DANFA	Psychiatrie
&Mme	Elisabeth	FELLER	DANSOKHO	Maladies Infectieuses
Melle	Ndèye Mery		DIA	Maladies Infectieuses
Mme	Ramatoulaye		DIAGNE	Pédiatrie
M.	Bay Karim		DIALLO	O.R.L
M.	Oumar		DIARRA	Chirurgie Générale
M.	Babacar		DIAO	Urologie
M.	Maboury		DIAO	Cardiologie
M	Madieng		DIENG	Chirurgie Générale
* M	Mamadou Moustapha		DIENG	Cancérologie
M.	Charles Bertin		DIEME	Orthopédie-traumatologie
M.	Rudolph		DIOP	Stomatologie
M.	Serigne Modou KANE		GUEYE	Gynécologie-Obstétrique
M	Ibrahima		KONATE	Chirurgie Générale
M.	Abdoulaye		LEYE	Clinique Médicale
Mme	Aminata DIACK		MBAYE	Pédiatrie
M.	Amadou Koura		NDAO	Neurologie
Mme	Marième		NDIAYE	Psychiatrie
Mme	Ndèye Nguénare DIOP		NIANG	Dermatologie
M.	Gabriel		NGOM	Chirurgie Générale
Mme	Fatou Samba D. NDIAYE		SENE	Médecine Interne
M.	Idrissa		SENE	O.R.L
Mme	Nafissatou Oumar		TOURE	Pneumologie
M.	Silly		TOURE	Stomatologie
Mme	Aïssatou Magatte		WANE	Ophthalmologie

ATTACHES CHEFS DE CLINIQUE

M.	Mamadou		COUME	Médecine Interne I
Melle	Yacine		DIA	Pneumologie
M.	Ansoumana		DIATTA	Pneumologie

ATTACHES-ASSISTANTS

Mme.	Nafissatou	NDIAYE	BA	Anatomie Pathologique
M.	Babacar		FAYE	Parasitologie
Melle	Roughyatou		KA	Bactériologie
*M.	Ibrahima		SECK	Médecine Préventive
M.	Mohamed M.		SOUMAH	Médecine Légale

* Associé
& Détachement

II. PHARMACIE

PROFESSEURS TITULAIRES

M. Doudou	BA	Chimie Analytique et Toxicologie
M. Emmanuel	BASSENE	Pharmacognosie et Botanique
M. Cheikh Saad Bouh	BOYE	Bactériologie-Virologie
Mme Aïssatou Gaye	DIALLO	Bactériologie-Virologie
+ M. Alioune	DIEYE	Immunologie
* M. Babacar	FAYE	Pharmacologie et Pharmacodynamie
M. Issa	LO	Pharmacie Galénique
* M. Souleymane	MBOUP	Bactériologie-Virologie
* M. Omar	NDIR	Parasitologie

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

M. Mamadou	BADIANE	Chimie Thérapeutique
M. Mounirou	CISS	Toxicologie
* M. Aynina	CISSE	Biochimie Pharmaceutique
M. Balla Moussa	DAFFE	Pharmacognosie
Mme Aminata SALL	DIALLO	Physiologie Pharmaceutique
M. Pape Amadou	DIOP	Biochimie Pharmaceutique
M. Amadou	DIOUF	Toxicologie

MAITRES-ASSISTANTS

Melle Issa Bella	BAH	Parasitologie
M. Mounibé	DIARRA	Physique Pharmaceutique
* M. Amadou Moctar	DIEYE	Pharmacologie et Pharmacodynamie
M. Yérém Mbagnick	DIOP	Chimie Analytique
M. Modou	LO	Botanique
M. Bara	NDIAYE	Chimie Analytique
Mme Maguette D.SYLLA	NIANG	Biochimie Pharmaceutique
Mme Rita B.	NONGONIERMA	Pharmacognosie
M. Matar	SECK	Pharmacie Chimique et Chimie Orga.
M. Oumar	THIOUNE	Pharmacie Galénique

ASSISTANTS

M. William	DIATTA	Botanique
M. Mouhamed Lamine	DIAW	Immunologie
Melle Thérèse	DIENG	Parasitologie
M. Tandakha NDIAYE	DIEYE	Immunologie
M. Ahmédou Bamba K.	FALL	Pharmacie Galénique
M. Moï	GUEYE	Physiologie Pharmaceutique
M. Pape Madieye	GUEYE	Biochimie Pharmaceutique
M. Mamadou	FALL	Toxicologie
Mme Aïssatou GUEYE	NDIAYE	Bactériologie-Virologie
M. Augustin	NDIAYE	Physique Pharmaceutique
* M. Mamadou	NDIAYE	Pharmacologie et Pharmacodynamie
Mme. Philomène LOPEZ	SALL	Biochimie Pharmaceutique

* Associé

+ disponibilité

M. Mamadou	SARR	Physiologie Pharmaceutique
* M. Elimane Amadou	SY	Chimie Générale et Minérale

M.	Guata yoro	SY	Pharmacologie et Pharmacodynamie
M.	Alassane	WELE	Chimie Physique

ATTACHES

M.	Alioune Dio	FALL	Pharmacognosie
Mme	Oumou BARRY	KANE	Toxicologie
M.	Modou Oumy	KANE	Physiologie Pharmaceutique
M.	Gora	MBAYE	Physique Pharmaceutique
M	Sarra	NGOM	Pharmacie Galénique

* Associé

III. CHIRURGIE DENTAIRE

PROFESSEURS TITULAIRES

M Ibrahima &Mme Ndioro	BA NDIAYE	Pédodontie-Prévention Odontologie Préventive et Sociale
---------------------------	--------------	--

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

*M. Boubacar	DIALLO	Chirurgie Buccale
M. Papa Demba	DIALLO	Parodontologie
Mme Charlotte	FATY NDIAYE	Chirurgie Buccale
M Malick	SEMBENE	Parodontologie

MAITRES-ASSISTANTS

Mme Khady DIOP	BA	Orthopédie Dento-Faciale
M. Daouda	CISSE	Odontologie Prév. et Sociale
*M. Falou	DIAGNE	Orthopédie Dento-Faciale
Mme Fatou	DIOP	Pédodontie-Prévention
M. Malick	FAYE	Pédodontie
Melle Fatou	GAYE	Odontologie Cons. Endodontie
M. Abdoul Wahab	KANE	Odontologie Cons. Endodontie
*M. Mohamed Talla	SECK	Prothèse Dentaire
Mme Soukèye DIA	TINE	Chirurgie Buccale
M. Abdoul Aziz	YAM	Pédodontie-Prévention

ASSISTANTS

M Abdou	BA	Chirurgie Buccale
Mme Aissatou TAMBA	BA	Pédodontie-Prévention
M Henri Michel	BENOIST	Parodontologie
Mme Adam Marie A. SECK	DIALLO	Parodontologie
*M. Lambane	DIENG	Prothèse Dentaire
M. Babacar	FAYE	Odontologie Cons. Endodontie
M. Daouda	FAYE	Odontologie Prév. et Sociale
M. Cheikh Mouhamadou M.	LO	Odontologie Prév. Sociale
*M Malick	MBAYE	Odontologie Cons. Endodontie
M Edmond	NABHANE	Prothèse Dentaire
*M. Pape Ibrahima	NGOM	Orthopédie Dento Faciale
M. Cheikh	NDIAYE	Prothèse Dentaire
Mme Faramata youga DIENG	SARR	Matières Fondamentales
M. Mouhamed	SARR	Odontologie Cons. Endodontie
M Babacar	TOURE	Odontologie Cons. Endodontie
M Saïd Nour	TOURE	Prothèse Dentaire

ATTACHES

M. Abdoulaye	DIOUF	Parodontologie
M. Alpha	KOUNTA	Chirurgie Buccale
M. Oumar Harouna	SALL	Matières Fondamentales
M. El Hadj Babacar	MBODJ	Prothèse Dentaire
Mlle Fatou	LEYE	O.C.E.

* Associé

DEDICACES



Au Tout Puissant ALLAH et à son Prophète MOUHAMED (PSL)

A mes parents. Qu'ALLAH vous donne une meilleure santé et nous garde longtemps ensemble.

A ma femme Aïssa et à mes enfants Abdoul Karim, Salimata, Abdoul Rahim et Hicham. Ce travail est aussi le vôtre pour avoir supporté mes multiples absences dans le cadre de cette thèse. Toute mon affection.

A la mémoire de mon frère Illiassou Mamadou et de son épouse Ouwani. Que leurs âmes reposent en paix.

A tous mes frères et sœurs, cousins et cousines. Restons toujours unis.

A ma belle famille. Tout mon attachement.

A Madame le Recteur de l'Université Abdou Moumouni de Niamey et à Monsieur le Doyen de la Faculté des Sciences de la Santé. Merci pour toutes les autorisations d'absence et pour vos encouragements.

A mes amis et collègues de Niamey, de Dakar et de Montpellier. Puissent l'amitié et la collaboration qui nous lient se développer davantage dans la considération réciproque.

A tous mes compatriotes souffrant du VIH/SIDA.



A NOS MAITRES ET JUGES ...

A notre Maître et Président du Jury, le Professeur Doudou BA

Nous gardons un bon souvenir de votre enseignement. Vos qualités scientifiques et votre sagesse nous ont marqué. C'est un grand honneur que vous nous faites en acceptant spontanément de présider le jury de cette thèse. Soyez assuré de notre sincère gratitude.

A notre Maître et Directeur de Thèse, le Professeur Souleymane MBOUP

Vous avez été présent à toutes les grandes étapes de notre carrière: de l'internat dans votre service à cette thèse, en passant par les recommandations à l'Institut Pasteur de Dakar pour la première thèse et le DEA, ainsi que pour les Cours Pasteur de Paris. Vos compétences scientifiques, votre sincérité et votre sens des relations humaines nous ont toujours inspiré. Soyez assuré de notre gratitude, de notre loyauté et de notre disponibilité à poursuivre une collaboration fructueuse.

A notre Maître et Directeur de Thèse, le Professeur Eric DELAPORTE

Nous gardons de bons souvenirs de votre laboratoire, notamment l'enthousiasme et la célérité avec lesquels sont traités nos problèmes de séjour et de travail à Montpellier. Durant cette collaboration qui doit se poursuivre, nous avons apprécié vos qualités scientifiques et humaines indéniables. Sincères remerciements.

A notre Maître et Rapporteur de Thèse, le Professeur François SIMON

C'est un grand honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce modeste travail, et d'en être le rapporteur. Nous savons, à travers la littérature scientifique, l'intérêt que vous portez à la recherche sur le VIH. Nous vous remercions d'avance pour vos observations qui seront les bienvenues.

A notre Maître et Rapporteur de Thèse, le Professeur Aïssatou GAYE DIALLO

Maman Ayou, nous avons été marqué par votre passion pour la microbiologie, votre rigueur ainsi que votre sens de l'organisation et des relations humaines. Merci d'avoir accepté de juger notre travail et d'en être le rapporteur.

REMERCIEMENTS

Au Docteur Martine PEETERS.

Merci de m'avoir accepté dans votre laboratoire et encadré avec une haute maîtrise du sujet. Soyez assurée de ma gratitude et de ma disponibilité à poursuivre cette collaboration aussi longtemps que nécessaire.

Aux Docteurs Céline MONTAVON et Nicole VIDAL.

Votre contribution efficace m'a été précieuse pour l'aboutissement de cette thèse. Sincère gratitude.

Au Docteur Ndèye Coumba TOURE-KANE.

Je t'ai fatiguée depuis l'autre millénaire pour mes formalités d'inscription annuelle, et j'ai encombré ton bureau durant plusieurs semaines. Merci pour tes encouragements, ta disponibilité et ta patience. Toutes mes amitiés.

A mon jeune collègue Dr Omar ADAMOU. Merci pour ta disponibilité et ton soutien. Du courage et bonne chance pour tes certificats.

Aux personnels du Laboratoire de Bactériologie-Virologie du CHU Le Dantec de Dakar, de l'UR36-Laboratoire Rétrovirus de l'IRD de Montpellier, et du Laboratoire de Biologie et de la Banque de Sang de l'Hôpital National de Niamey.

Je ne pourrais citer tout le monde, mais je n'oublie personne.

A l'Agence Nationale de Recherche sur le SIDA, Action Coordonnée N°12.

A tout ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

« Par délibération, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation, ni improbation »

LISTE DES ABREVIATIONS

aa	acide aminé
AAVI	<i>African AIDS Vaccine Initiative</i>
ACTG	<i>AIDS Clinical Trial Group</i>
ADCC	<i>Antibody Depending Cellular Cytotoxicity</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
Ag	Antigène
ANRS	Agence Nationale de Recherche sur le SIDA
AP-1	<i>Activator Protein-1</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARV	Antirétroviral
AZT	Azidothymidine
C (C1-C5)	Conservé (domaine)
CA	Capside
CCR5	<i>CC-Chemokine Receptor 5</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDC	<i>Centers for Diseases Control</i>
CoMA	<i>Combinatorial Melting Assay</i>
COUP	<i>Chiken Ovalbumine Upstream Promotor complex</i>
cpx	
CRF	<i>Circulating Recombinant Form</i>
CTL	<i>Cytotoxic T Lymphocytes</i>
CXCR4	<i>CXC-Chemokine Receptor 4</i>
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Nonintegrin</i>
DC-SIGNR	<i>Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Nonintegrin-Related</i>
ddNTP	didésoxynucléotide triphosphate
dNTP	désoxynucléotide triphosphate
EDTA	Ethylène diamine tétra-acétate
EIA	<i>Enzyme Immuno-Assay</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay</i>
gag	<i>group antigen</i>
gp	<i>glycoprotéine</i>
GSEIA	<i>Group-Specific-Enzyme Immuno Assay</i>
HERV	<i>Human Endogenous Retrovirus</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HMA	<i>Heteroduplex Mobility Assay</i>
HLA	<i>Human Leucocytes Antigens</i>
HSPG	<i>Heparin Sulfate Proteoglycans</i>
HTLV	<i>Human T Lymphotropic Virus</i>
IAVI	<i>International AIDS Vaccine Initiative</i>
IbNG	Ibadan Nigeria
IN	<i>Integrase</i>
INNTI	Inhibiteur Non Nucléosidique de la Transcriptase Inverse
INTI	Inhibiteur Nucléosidique de la Transcriptase Inverse
IP	Inhibiteur de la Protéase
ITAC	<i>International HIV Treatment Access Coalition</i>
Kb	Kilobase
LAV	<i>Lymphadenopathy Associated Virus</i>

LIA	<i>Line Immunoblot-Assay</i>
LIPA	<i>Line Probe Immuno Assay</i>
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
MA	<i>Matrice</i>
MHA	<i>Multi-region Hybridization Assay</i>
MHR	<i>Major Homology Region</i>
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
NASBA	<i>Nucleic Acid Sequence Based Amplification</i>
NC	<i>Nucleocapside</i>
Nef	<i>Negative expression factor</i>
NF-AT	<i>Nuclear Factor for Activated T-cells</i>
NF- κ B	<i>Nuclear Factor-Kappa B</i>
NLS	<i>Nuclear Localisation Signal</i>
NSI	<i>Non Syncitium Inducing</i>
ONUSIDA	<i>Programme commun des Nations Unies sur le SIDA</i>
PBS	<i>Primer Binding Site</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PM	<i>Poids Moléculaire</i>
PMA	<i>Point Mutation Assay</i>
Pr	<i>Précurseur</i>
RANTES	<i>Regulated or Activation Normal T-Expressed and Secreted</i>
RARS	<i>Réseau Africain de Recherche sur le SIDA</i>
Rev	<i>Regulator of expression virion protein</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RIBA	<i>Recombinant Immuno-Blot Assay</i>
RIPA	<i>Radio-Immuno-Precipitation Assay</i>
RRE	<i>Rev Responsive Element</i>
RT	<i>Reverse Transcriptase</i>
RVA	<i>Recombinant Virus Assay</i>
SDF-1	<i>Stromal cell-Derived Factor</i>
SI	<i>Syncitium Inducing</i>
SIDA	<i>Syndrome d'immunodéficience acquise</i>
SIV	<i>Simian Immunodeficiency Virus</i>
SU	<i>Surface</i>
SSEIA	<i>Subtype Specific Enzyme Immuno-Assay</i>
TAF	<i>TATA-Associated Factors</i>
TAR	<i>Trans-Activation Responsive region</i>
Tat	<i>Trans-activator of transcription</i>
TBP	<i>TATA Binding Protein</i>
TCF-1a	<i>T-Cell Factor-1a</i>
TM	<i>Transmembranaire</i>
UBP-1	<i>Untranslated Binding Protein</i>
USF	<i>Upstream Stimulatory Factor</i>
V (VI-V5)	<i>Variable (domaine)</i>
VIH	<i>Virus de l'Immunodéficience Humaine</i>
Vif	<i>Viral infectivity factor</i>
Vpr	<i>Viral protein R</i>
Vpu	<i>Viral protein U</i>
Vpx	<i>Viral protein X</i>

ABRÉVIATIONS DÉSIGNANT LES ACIDES AMINÉS

A	Ala	Alanine	N	Asn	Asparagine
B	Asx	Asparagine ou acide aspartique	P	Pro	Proline
C	Cys	Cystéine	Q	Gln	Glutamine
D	Asp	Acide aspartique	R	Arg	Arginine
E	Glu	Acide glutamique	S	Ser	Sérine
F	Phe	Phénylalanine	T	Thr	Thréonine
G	Gly	Glycine	V	Val	Valine
H	His	Histidine	W	Trp	Tryptophane
I	Ile	Isoleucine	X	acide aminé quelconque	
K	Lys	Lysine	Y	Tyr	Tyrosine
L	Leu	Leucine	Z	Glx	Glutamine ou acide glutamique
M	Met	Méthionine			

LISTES DES TABLEAUX ET FIGURES

TABLEAUX

- Tableau I : Classification des rétrovirus exogènes.
 Tableau II : Classification morphologique et historique des rétrovirus.
 Tableau III : Tropisme cellulaire du VIH
 Tableau IV : Principaux points de comparaison entre VIH-1 et VIH-2.
 Tableau V : Principaux médicaments antirétroviraux.
 Tableau VI : Principales mutations et conséquences sur la sensibilité du VIH-1 aux INTI.
 Tableau VII : Principales mutations et conséquences sur la sensibilité du VIH-1 aux INNTI.
 Tableau VIII. Principales mutations et conséquences sur la sensibilité du VIH-1 aux IP.
 Tableau IX : Propositions de relais de traitement en cas d'échec virologique.
 Tableau X : Amorces utilisées pour le séquençage génomique complet.

FIGURES

- Figure 1 : Les six lignées décrites chez les Lentivirus des Primates
 Figure 2 : Modélisations structurales d'un virion VIH-1.
 Figure 3 : Rapports génome-progénomme-gènes du VIH
 Figure 4 : Protéines d'enveloppe du VIH-1.
 Figure 5 : Récepteurs de chimiokines.
 Figure 6 : Attachement-Fusion-Pénétration du VIH-1 pour les infections CD4-dépendante et CD4-indépendante.
 Figure 7 : Rétrotranscription du génome en ADN proviral.
 Figure 8 : Relations phylogénétiques entre les trois groupes de VIH-1, ainsi que la subdivision en sous-types et sous-sous-types dans le groupe M.
 Figure 9 : Relations Phylogénétiques entre sous-types et sous-sous-types du VIH-1 groupe M.
 Figure 10 : Cartographie génomique de treize des quinze premiers CRFs décrits.
 Figure 11 : Distribution géographique globale des variants VIH-1.
 Figure 12 : Carte géographique du Niger.
 Figure 13 : Arbres phylogénétiques avec les séquences partielles *env* et *gag* montrant la filiation génétique des 110 souches VIH-1 étudiées.
 Figure 14 : Distribution globale des variants VIH-1 identifiés.
 Figure 15 : Distribution des variants VIH-1 en 1997.
 Figure 16 : Distribution des variants VIH-1 en 2000.
 Figure 17 : Positions d'appariement des amorces utilisées le long du génome du VIH-1.

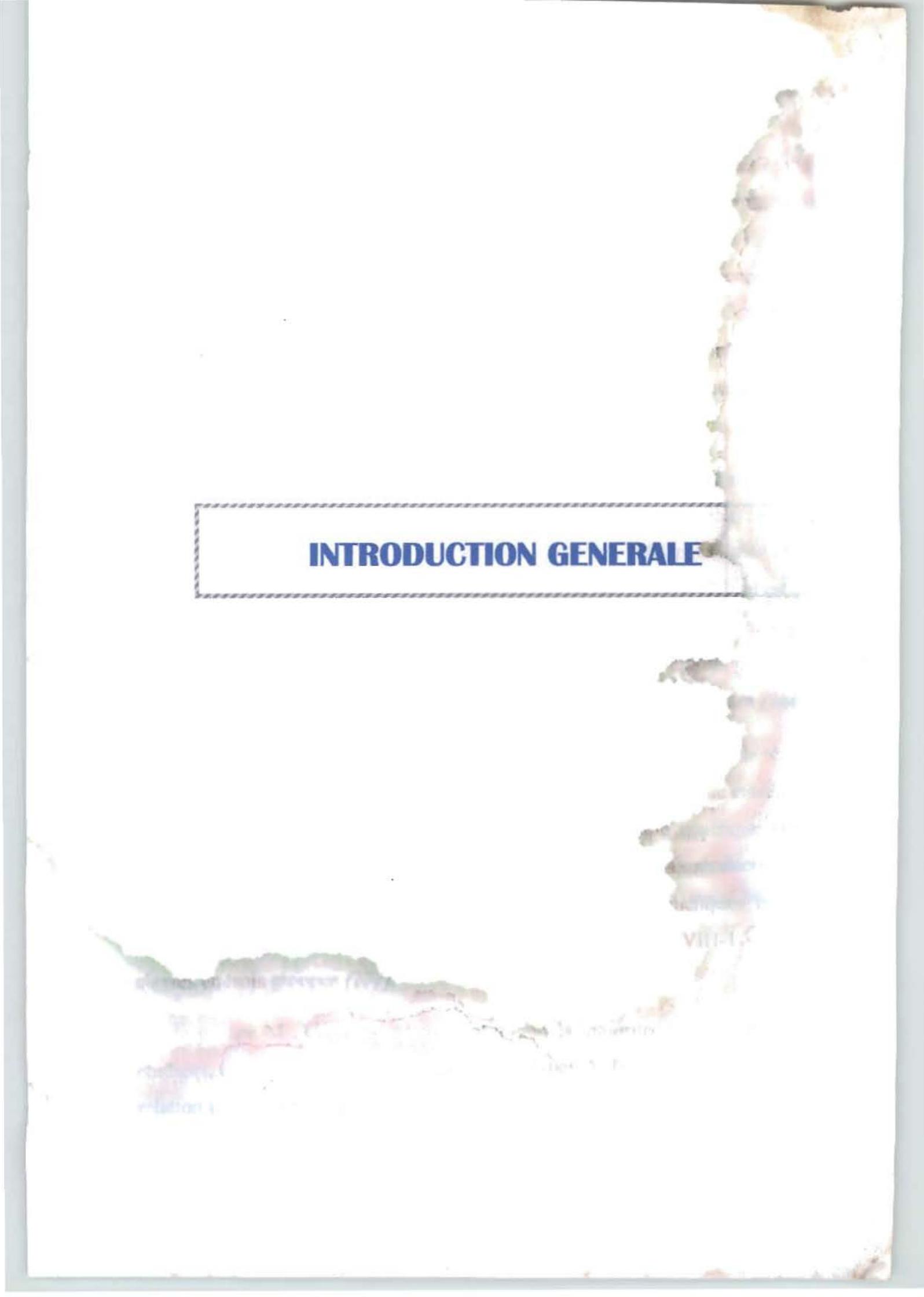
PLAN

INTRODUCTION GENERALE.....	1
PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	
GENERALITES SUR LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE.....	2
I-TAXONOMIE, PHYLOGENIE MOLECULAIRE ET ORIGINE DU VIH.....	3
II- MORPHOLOGIE ET STRUCTURE DU VIRION	4
1-Morphologie.....	5
2-Structure.....	6
III-ORGANISATION GÉNÉTIQUE DU VIH-1.....	7
1-Rapports ARN génomique-ADN proviral.....	8
2-Gènes de structure.....	12
2.1-Gène <i>gag</i>	12
2.2-Gène <i>pol</i>	13
2.3-Gène <i>env</i>	14
3-Gènes de régulation.....	15
3.1-Gène <i>tat</i>	15
3.2-Gène <i>rev</i>	16
3.3-Gène <i>nef</i>	17
3.4-Gène <i>vif</i>	17
3.5-Gène <i>vpr</i>	18
3.6-Gène <i>vpu</i>	18
4-Séquences LTR.....	19
4.1-LTR 5'.....	19
4.1.1-Région modulatrice.....	19
4.1.2-Région "core".....	20
4.1.3-Région TAR.....	20
4.2-LTR 3'.....	20
IV-MODES DE TRANSMISSION DU VIH.....	21
1-Transmission par le sang et dérivés.....	21
1.1-Transmission sanguine.....	21
1.2-Transmission par voie intraveineuse.....	21
1.3-Transfusion et coagulés par du matériel souillé.....	21
2-Transmission par voie sexuelle.....	22
3-Transmission par voie verticale.....	23

3-Transmission mère-enfant.....	25
V- CYCLE DE MULTIPLICATION.....	26
1-Tropisme cellulaire du VIH.....	26
2-Etapes du cycle de multiplication.....	29
2.1-Attachement-Fusion-Pénétration.....	29
2.2-Rétrotranscription du génome viral.....	30
2.3-Transfert nucléaire et intégration de l'ADN proviral.....	30
2.4-Expression des gènes viraux.....	31
2.5-Assemblage-Maturation-Libération des virion.....	32
VI- PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFECTION A VIH.....	33
1-Phase de primo-infection.....	33
2-Phase de latence clinique.....	34
3-Phase symptomatique aboutissant au SIDA.....	35
4-Cas des sujets "non progressseurs à long terme".....	36
5-Particularités de l'infection à VIH-2.....	37
VII-DIAGNOSTIC DE L'INFECTION A VIH.....	38
1-Diagnostic clinique.....	38
2-Diagnostic biologique.....	38
2.1-Diagnostic direct.....	38
2.2-Diagnostic indirect.....	39
2.2.1-Tests de dépistage.....	39
2.2.2-Tests de confirmation.....	39
2.2.3-Algorithmes simplifiés.....	40
VIII-TRAITEMENT ANTIRETROVIRAL.....	41
1-Aspects pharmacologiques.....	41
2-Résistances aux antirétroviraux (ARV).....	42
2.1-Principales mutations induisant des résistances.....	42
2.2-Modes d'origine des résistances aux ARV.....	43
2.3-Tests de dépistage des résistances.....	44
2.4-Tests de confirmation des résistances.....	45
2.5-Algorithmes simplifiés.....	46
2.6-Réponse clinico-biologique des résistances.....	47
2.7-Stratégies thérapeutiques.....	48
2.8-Accès aux ARV en Afrique Subsaharienne.....	49

I-DIFFERENTS TYPES DE VARIABILITE DU VIH	
1-Variabilité génétique.....	52
1.1-Déterminisme.....	52
1.2-Diversité génétique du VIH-1.....	57
1.2.1-VIH-1 du groupe M.....	57
1.2.1.1-Sous-types et sous-sous-types.....	57
1.2.1.2-CRFs.....	60
1.2.1.3-Autres recombinants VIH-1.....	60
1.2.2-VIH-1 du groupe O.....	60
1.2.3-VIH-1 du groupe N.....	61
1.2.4-Distribution géographique des variants VIH-1.....	61
1.3-Diversité génétique du VIH-2.....	62
2-Variabilité biologique du VIH-1.....	63
2.1-Variants R5, R5X4 et X4.....	63
2.2-Variants <i>Rapid/High</i> et <i>Slow/Slow</i>	63
2.3-Variants NSI et SI.....	64
3-Variabilité antigénique du VIH-1.....	64
II-CONSEQUENCES DE LA VARIABILITE DU VIH	65
1- Variabilité et transmission du VIH.....	65
2- Variabilité et pathogenèse de l'infection à VIH.....	66
3-Variabilité et diagnostic biologique de l'infection à VIH.....	67
3.1-Variabilité et sérologie.....	67
3.2-Variabilité et techniques de biologie moléculaire.....	67
3.2.1-Influence sur la détection de l'ADN proviral par PCR.....	67
3.2.2-Influence sur la quantification de l'ARN viral plasma.....	68
4-Variabilité et traitement antirétroviral.....	67
5-Variabilité et développement vaccinal.....	67
III-SIGNIFICATION ET LIMITES DE LA VARIABILITE	
IV-METHODES D'IDENTIFICATION DES VARIANTS VIH-1	
1-Identification des variants du groupe O.....	
2-Identification des variants du groupe M.....	
2.1-Technique IIMV.....	
2.2-Séquençage et Analyse des Séquences.....	
2.3-Séquençage.....	

2.2.1.1-Méthodes chimiques.....	77
2.2.1.2-Méthodes enzymatiques.....	77
2.2.2-Analyse des séquences: phylogénie moléculaire.....	74
2.3-Autres méthodes d'identification de soustypes.....	75
2.3.1-Sérotypage.....	75
2.3.2-Technique CoMA.....	75
2.3.3-PCR spécifique du soustype A.....	75
2.3.4-Hybridation Moléculaire avec des sondes spécifiques.....	75
2.3.5-RFLP.....	75
3-Identification des variants du groupe N.....	75
DEUXIEME PARTIE : NOS TRAVAUX DE RECHERCHE.....	80
APERCU SUR LE NIGER ET CADRE DE TRAVAIL.....	80
GENOTYPAGE DES SOUCHES DE VIH-1 GROUPE M ET ANALYSE DE CERTAINS	80
GENOMES MOSAIQUES.....	80
Publication N° 1 : « Predominance of CRF02_AG and CRF06_cpx in Niger, West Africa ».....	84
Publication N° 2 : « A propos d'une association infection à VIH et noma au Niger ».....	91
Publication N° 3 : « Emergence of complex and diverse CRF02_AG and CRF06_cpx recombinant HIV-1 strains in Niger, West Africa ».....	96
SERO-EPIDEMIOLOGIE ET CARACTERISATION MOLECULAIRE DU VIH-1 GROUPE O.....	107
Publication N° 4 : « Geographical distribution of HIV-1 group O in Africa ».....	107
Publication N° 5 : « Molecular characterization of the envelope transmembrane glycoprotein of 13 new human immunodeficiency virus type 1 group O strains from six different african countries ».....	107
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	107
Conclusions.....	107
Perspectives.....	107
BIBLIOGRAPHIE.....	107
RESUME-ABSTRACT.....	107

A watercolor-style map of the Philippines is visible in the background, showing the main islands and surrounding waters. The map is rendered in soft, blended colors of blue, green, and brown. The title 'INTRODUCTION GENERALE' is superimposed on the map.

INTRODUCTION GENERALE

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH), plus de vingt ans après sa découverte, et malgré les progrès considérables enregistrés dans ce domaine, demeure encore un défi sanitaire mondial. Sa propagation, malgré des campagnes de prévention largement menées, n'est pas endiguée. Selon le Programme commun des Nations Unies sur le VIH/SIDA, ONUSIDA (150), 42 millions de personnes sont infectées en fin 2002, dont 29,4 millions en Afrique Subsaharienne où, durant cette seule année, il y a eu 2,4 millions de décès dus au SIDA et 3,5 millions de nouveaux cas d'infection. Le taux de prévalence dans la population générale dépasse 20% dans sept pays d'Afrique Australe, avec un record mondial de 38 % au Botswana.

La pandémie, dont les premiers cas ont été décrits en 1981 aux Etats-Unis d'Amérique (41, 57, 118), est surtout le fait du VIH-1 découvert deux ans plus tard par Barré-Sinoussi et al (25). Quant au VIH-2 isolé en 1986 par Clavel et al (65) peu de temps après sa mise en évidence sérologique au Sénégal (22), il est confiné presque exclusivement en Afrique de l'Ouest où sa prévalence semble en régression (296), pendant qu'il est sporadiquement retrouvé dans des régions plus ou moins éloignées comme l'Inde (255), le Portugal (159, 334) ou les Philippines (186).

Un des aspects biologiques les plus marquants du VIH est son hétérogénéité génétique, qui commence d'abord par la divergence phylogénétique entre le VIH-1 et le VIH-2 qui ne possèdent que 40 à 60 % d'homologie génétique (140). Au niveau intra-typique, le VIH-2 renferme actuellement 7 sous-types décrits A, B, C, D, E, F et G (62, 108, 351), qui, par rapport aux distances génétiques, répondent à la définition de groupe décrits pour le VIH-1. Les variants VIH-1 sont classés en trois groupes (277):

-le groupe M (*Major ou Main*) renfermant la majorité des souches VIH-1 étudiées, et comprenant actuellement 9 sous-types A, B, C, D, E, F1, F2, F3. La relation phylogénétique des sous-types B et D devrait les faire considérer comme des sous-sous-types d'un même sous-type, mais ce changement n'a pas été formalisé pour des considérations historiques. Par contre le même type

d'argument a conduit à subdiviser les sous-types A et F en sous-sous-types A1, A2 et F1, F2.

-le groupe O (*Outlier*) (59), formé de variants hautement divergents, initialement décrits au Cameroun et chez des patients originaires de cette région (76, 123, 331).

-le groupe N (*Non-M/non-O*) dont les premières souches décrites proviennent également du Cameroun (20, 304).

Les divergences génétiques des VIH-1 groupe M, outre la subdivision en sous-types, sous-sous-types et recombinants, peuvent engendrer des conséquences sur la pathogénèse, la transmission virale, le diagnostic biologique, la sensibilité aux antirétroviraux et sur le développement vaccinal. Il est donc nécessaire d'étudier le profil et l'évolution de la distribution de ces variants génétiques dans chaque région géographique.

Quant aux VIH-1 groupe O, l'intérêt qu'ils ont suscité tenait tout d'abord au fait que certains tests sérologiques de dépistage d'alors furent mis en défaut (196, 295, 303), avec des conséquences sur le plan diagnostique et en matière de sécurité transfusionnelle, justifiant les différentes enquêtes séro-épidémiologiques très tôt entreprises pour cerner la distribution géographique des VIH-1 de ce groupe. De même, la résistance naturelle des virus O aux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (82) fait que leur diffusion compliquerait davantage le problème du traitement antirétroviral, tandis que le développement vaccinal pourrait tenir compte entre autre de l'inefficacité des anticorps neutralisants contre VIH-1 groupe O sur les souches VIH-1 groupe M (232).

Au Niger où le nombre de personnes vivant avec le VIH est estimé à plus de 70000 en fin 2001, aucune donnée sur la diversité génétique du VIH-1 n'est disponible auparavant. Nous avons trouvé opportun d'entreprendre la présente étude qui entre dans le cadre de l'Action Coordonnée (2001-2003) au programme multicentrique de l'Agence Nationale de Recherche sur le SIDA (ANRS), et d'

Coopération Française.

L'objectif général de cette thèse est de **contribuer à l'étude de la diversité génétique du VIH-1 au Niger**, pays membre du Réseau Africain de Recherche sur le SIDA (RARS).

Nos travaux visent les **cinq objectifs spécifiques** suivants:

- 1-Déterminer les variants génétiques de VIH-1 groupe M circulant **au Niger** dans une population de personnes vivant avec le VIH.
- 2-Décrire les variations éventuelles de la distribution des variants de **VIH-1 groupe M** au cours du temps.
- 3-Analyser le génome complet de souches particulières de **VIH-1 groupe M**.
- 4-Etudier rétrospectivement la co-circulation du VIH-1 groupe **O**.
- 5-Characteriser génétiquement les souches éventuelles de **VIH-1 groupe O**.

Le présent document comporte deux grandes parties:

- la revue bibliographique, principalement centrée sur les aspects **virologiques du VIH-1** et la problématique de la variabilité de ce virus.
- la présentation des travaux effectués sur le VIH-1 des **groupes M et O**.

Première Partie :
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

**GENERALITES SUR LE VIRUS DE
L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE**

I. TAXONOMIE , PHYLOGENIE MOLECULAIRE ET ORIGINE DU VIH.

Le VIH appartient à la **famille des *Retroviridae*** constituée par les virus à ARN se répliquant en passant par une étape d'ADN grâce une transcriptase inverse (TI) virionique. Cette famille virale et celles des *Metaviridae* et des *Pseudoviridae* forment le Groupe VI de la classification virale de David Baltimore ([www.virology.net/Big Virology/BVFamilyGroup.html](http://www.virology.net/Big_Virology/BVFamilyGroup.html)). Mais la capacité de rétro-transcription est également retrouvée chez les virus à ADN se répliquant en passant par une étape d'ARN secondairement rétro-transcrit en ADN. Ce sont les *Hepadnaviridae*, les *Badnaviridae* et les *Caulimoviridae* qui forment le Groupe VII de Baltimore.

Actuellement, les **rétrovirus exogènes**, par opposition aux rétrovirus endogènes ou HERVs (*Human Endogenous RetroViruses*) (33) , sont subdivisés en sept genres (tableau 1) :

- les genres *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus* et *Epsilonretrovirus* formant la sous-famille des ***Oncovirinae***

- le genre *Lentivirus* formant la sous-famille des ***Lentivirinae***

- le genre *Spumavirus* formant la sous-famille des ***Spumavirinae***.

Le VIH est classé dans le **genre *Lentivirus***, et dans le "**sous-genre**" des ***Lentivirus des Primates***, à l'instar des virus de l'immunodéficience simienne ou SIV (*Simian Immunodeficiency Virus*).

Sur le plan phylogénétique, il y a de forts arguments en faveur de l'existence probable d'un ancêtre commun aux lentivirus des primates. Mais leur grande variabilité rend difficile l'estimation de la période à laquelle la dérive génétique a commencé. Au total, six lignées phylogénétiques de lentivirus des primates sont actuellement décrites : lignées SIVsm/HIV-2, SIVagm, SIVsyk, SIVcpz/HIV-1,

GENRE	PRINCIPAUX VIRUS
<i>Alpharetrovirus</i> (Rétrovirus type C aviaires)	<i>Avian Leukosis Virus, Avian Myeloblastosis Virus, Rous Sarcoma Virus...</i>
<i>Betaretrovirus</i> (Rétrovirus type C de mammifères)	<i>Mouse Mammary Tumor Virus</i>
<i>Gammaretrovirus</i> (Rétrovirus type C de mammifères)	→ Virus type C de mammifères: <i>Murine Leukemia Virus, Feline Leukemia Virus, Porcine type C oncovirus, Squirrel Monkey retrovirus</i> Oncovirus type C de reptiles: <i>Viper retrovirus</i> Virus de Reticuloendotheliose: <i>Reticuloendotheliosis Virus</i>
<i>Deltaretrovirus</i> (BLV-HTLV)	<i>Bovine Leukaemia Virus, Human T-Lymphotropic Virus, Simian T-Lymphotropic Virus</i>
<i>Epsilonretrovirus</i> (Rétrovirus type D)	<i>Mason-Pfizer monkey virus, Simian type D virus 1, Ovine Pulmonary Adenocarcinoma virus, Langur Virus</i>
<i>Lentivirus</i>	Lentivirus des Primates: <i>Human Immunodeficiency Virus, Simian Immunodeficiency Virus</i> Autres lentivirus: <i>Bovine Immunodeficiency Virus, Equine Infectious Anemia Virus, Feline Immunodeficiency Virus, Caprine Arthritis Encephalitis Virus, Visna/Maedi Virus</i>
<i>Spumavirus</i>	<i>Human Spumavirus, Simian Foamy Virus, Bovine Syncytial Virus</i>

S/F=sous-famille; SP=Spumavirinae.

Tableau I: Classification des rétrovirus exogènes, d'après Coffin et al (67).

SIVcol et SIVhoest (245).

Les deux types de virus, VIH-1 et VIH-2, appartiennent à deux lignées phylogénétiques différentes de lentivirus des primates : lignée SIVcpz/HIV-1 et lignée SIVsm/HIV-2 (figure 1). Leur origine simienne est établie.

Pour le VIH-1, le passage à l'homme s'est opéré à partir du chimpanzé, probablement la sous-espèce *Pan troglodytes troglodytes* d'Afrique Centrale dont les SIVs sont phylogénétiquement liés aux VIH-1 des groupes M, O, N (104). Un autre argument en faveur de cette possibilité est l'extrême diversité de variants VIH-1 circulant en Afrique Centrale, rapportée par diverses études (75, 230, 339, 340). De même, les souches de VIH-1 groupe N et celles des SIVcpz du Cameroun forment un même subcluster phylogénétique au niveau des gènes *env* et *nef* (70, 104). La divergence entre le VIH-1 et le SIVcpz remonterait à l'an 1700 de notre ère (292), tandis que la diversification du VIH-1 a dû commencer chez l'homme autour de 1931, entre 1915 et 1941 (175, 292, 361). L'analyse du rapport des mutations synonymes/mutations non synonymes sur les séquences des variants du groupe O connus montre que ce groupe est soit au moins aussi ancien que le groupe M (194), soit potentiellement plus variable. On admet également que les virus des groupes M, N et O proviennent de trois transmissions zoonotiques indépendantes du chimpanzé à l'Homme. Le risque d'autres contaminations humaines va encore exister tant que persisteront la chasse et la manipulation de viandes (*bushmeat*) de singes potentiellement infectés par certaines populations d'Afrique Subsaharienne (246).

Pour le VIH-2, la transmission à l'Homme s'est produite à partir du singe Sooty mangabey infecté par le SIVsm, probablement à l'occasion de plusieurs contaminations indépendantes (124). De plus, une forte homologie de séquences nucléotidiques existe entre les deux virus ; l'endémie à VIH-2 et l'enzootie à SIVSm sévissent dans la même région ouest-africaine où ce singe est chassé et consommé par certaines populations (205). Des sérologies rétrospectives ont mis en évidence la circulation du VIH-2 avant les années 1970 (47).

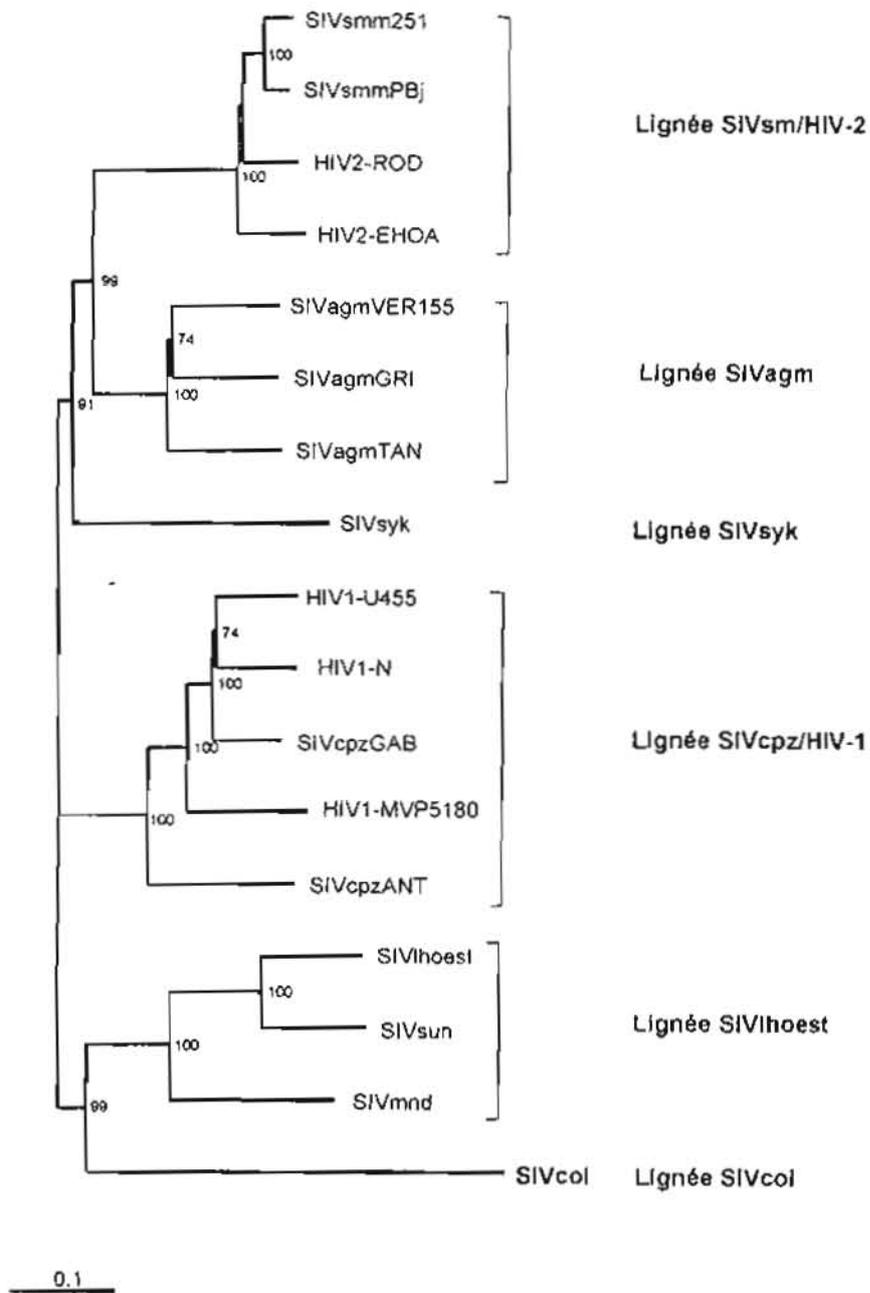


Figure 1: Les six lignées décrites chez les Lentivirus des Primates.
Peeters et al (245).

II-MORPHOLOGIE ET STRUCTURE DU VIRION VIH.

1.Morphologie.

Au microscope électronique, après coloration négative, les virions VIH matures se présentent sous forme de particules d'environ 100 nm de diamètre, de type morphologique C (tableau II). L'aspect morphologique des virions est identique pour les deux types de VIH.

TYPE DE PARTICULES	CARACTERISTIQUES	EXEMPLES
A	Particules immatures, intracellulaires, non enveloppées : <i>Endogenous Retrovirus-Like Genetic Elements</i>	<i>Human Endogenous Retroviruses</i>
B	Particules enveloppées, extracellulaires, avec un core condensé excentré, et des spicules proéminents.	<i>Mouse Mammary Tumor Virus</i>
C	Particules enveloppées, extracellulaires, avec un core central, et des spicules à peine visibles	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> <i>Human T-Lymphotropic Virus</i> <i>Bovine Leukaemia Virus</i> <i>Avian Leukaemia Virus</i> <i>Murine Leukaemia Virus</i>
D	Particules enveloppées, extracellulaires, légèrement plus grosses et avec des spicules moins proéminents	<i>Mason-Pfizer Monkey Virus</i>

Tableau II : Classification morphologique et historique des rétrovirus.

Les particules B, C et D correspondent au rétrovirus exogènes.

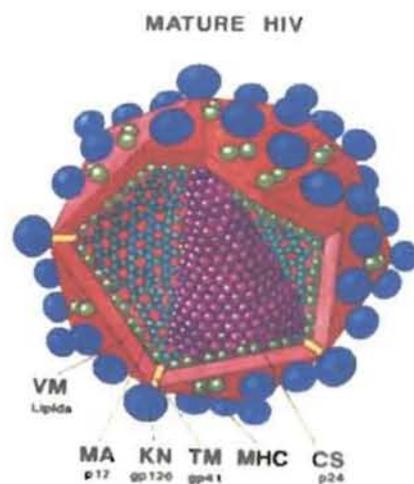
2. Structure du virion VIH.

Une particule virale mature comprend :

- un génome représenté par **deux copies identiques d'ARN** simple brin, linéaire, de polarité positive et d'environ 10 Kb.
- une **protéine basique p7NC** dont les molécules sont intimement liées au génome, avec lequel elles forment une structure ribonucléoprotéique compacte ou nucléocapside.
- deux enzymes: la **transcriptase inverse p66-p51** et l' **intégrase p31IN**.
- une **capside de symétrie icosaédrique formée de protéine p24CA**, et qui englobe, outre les éléments précédents, des molécules d'origine cellulaire dont le **tRNA Lys3** servant d'amorce lors de la rétrotranscription du génome.
- une **couche de protéine de matrice p17MA** qui recouvre la capside.
- une enveloppe dérivée de la membrane plasmique cellulaire, formée de la bicouche lipidique habituelle associée à **deux glycoprotéines virales**:
 - +la glycoprotéine transmembranaire **gp41** pour le VIH-1, **gp36** pour le VIH-2.
 - +la glycoprotéine externe **gp120** pour le VIH-1, **gp125** pour le VIH-2.

Deux exemples de modélisation structurale d'un virion VIH-1 mature sont représentés par la **figure 2 (A et B)**.

A.



B.

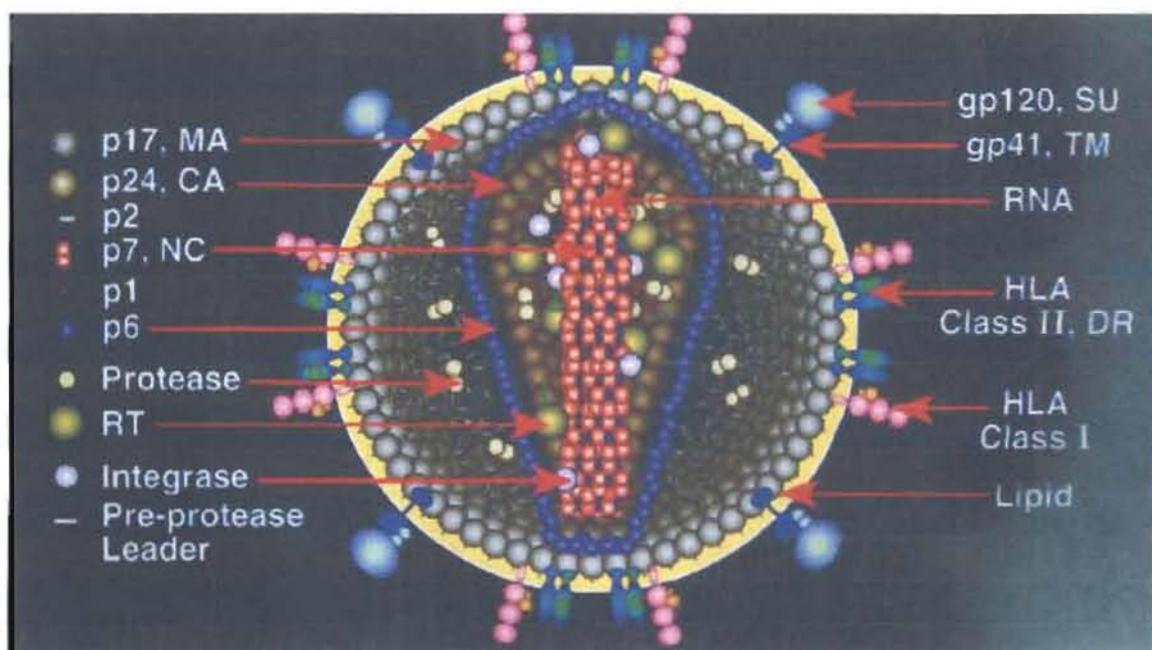


Figure 2 : Modélisations structurales d'un virion VIH-1

A. Aperçu en 3D du virion montrant la symétrie icosaédrique de la capside (http://www.virology.net/Big_virology/Special/Nermut/Retro.html)

B. Coupe virtuelle montrant les différents éléments structuraux d'origine virale ou cellulaire (<http://web.uct.ac.za/microbiology/cann/335/HIVmature.jpg>)

L'aspect morphologique général est identique pour les deux types de VIH.

III-ORGANISATION GENETIQUE.

1-Rapports ARN génomique-ADN proviral.

L'ARN virionique est coiffé en 5', polyadénylé en 3', et ne possède pas de LTR complet contrairement à l'ADN proviral. Le gène *vpx* est présent chez le VIH-2 qui n'a pas de *vpu*. En effet, en plus de l'organisation génomique « LTR-*gag-pol-vif-vpr-tat-rev-env-nef*-LTR » commune aux lentivirus des primates, les virus des lignées SIVcpz/HIV-1 et SIVsm/HIV-2 possèdent un gène supplémentaire : *vpu* en amont de *vpr* et chevauchant *env* pour les premiers, *vpx* en amont de *vpr* pour les seconds (245). Les correspondances structurales entre l'ARN génomique du VIH et l'ADN proviral, ainsi que les localisations des différents gènes sont illustrées par la figure 3.

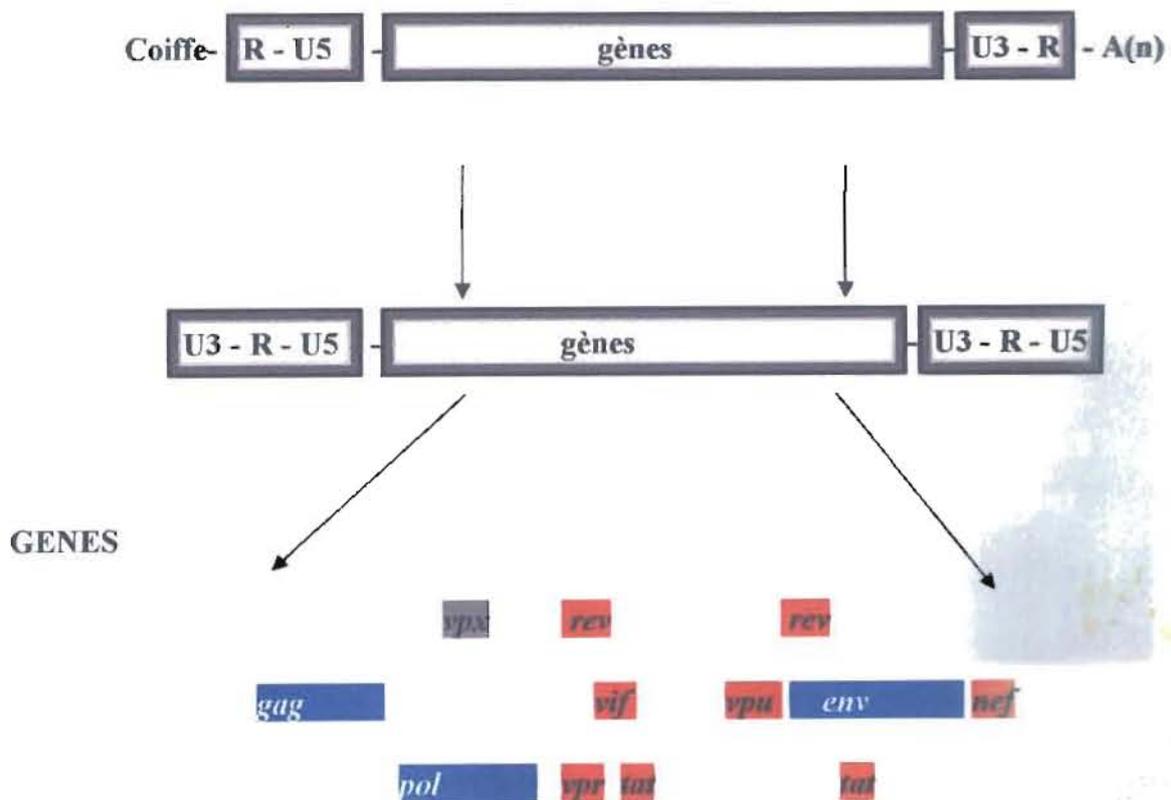


Figure 3 : Rapports génome-progénomme-gènes du VIH.

■ gènes de structure. ■ gènes de régulation .

2-Gènes de structure du VIH-1.

2.1-Gène gag (group antigen).

Ce gène code pour la **polyprotéine Pr55gag**, myristylée en N-terminal, capable de s'auto-associer et de faciliter l'incorporation des constituants virioniques dans la particule naissante. Ce précurseur sera clivée pendant l'assemblage par la protéase virale p10PR, activée par dimérisation, pour donner les quatre protéines p17MA, p24CA, p7NC et p6gag, et deux petits peptides p1 gag et p2gag.

La protéine de matrice p17MA intervient, après phosphorylation par les kinases cellulaires, dans le transport du complexe de pré-intégration du cytoplasme au noyau. Elle possède un signal de localisation nucléaire ou NLS (*Nuclear Localisation Signal*) entre les résidus 14-36 et 107-116. Elle joue aussi un rôle dans l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe.

La protéine de capsid p24CA possède un domaine de 190 aa impliqué dans la capacité d'auto-association, et une région d'homologie majeure ou MHR (*Major Homology Region*) contenant des aa conservés chez tous les lentivirus des primates. Ce MHR est nécessaire à l'efficacité de la réplication et de la production des virions.

La protéine p7NC : sa richesse en Arginine et Lysine lui confère une basicité qui est responsable de sa grande affinité pour les acides nucléiques. Cette affinité est rendue spécifique de l'ARN génomique par la présence dans la protéine de deux copies d'une séquence liant le zinc : Cys (X)2 Cys (X)4 His (X)4 Cys, appelée CCHC Zinc finger. Ainsi, durant l'assemblage, la p7NC et la région correspondante dans le Pr55gag assurent l'encapsidation de l'ARN génomique. Ce dernier possède à son extrémité 5' le site *psi* représentant le signal d'encapsidation. La protéine p7NC catalyse en outre la dimérisation de cet ARN.

La protéine p6gag : permet l'incorporation dans le virion de la protéine accessoire Vpr à laquelle elle reste associée (171).

Les peptides des p1gag et p2gag : leur rôle est mal connu. Cependant, la molécule p2gag interviendrait dans la modulation du clivage de la polyprotéine Pr55gag (254).

2.2-Gène *pol* (polymerase).

Il code pour trois enzymes virales: la protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase. Elles sont obtenues après clivage du domaine *pol* de la polyprotéine Pr160gag-pol, engendrée parallèlement au précurseur Pr55gag, mais en moindre quantité.

La Protéase p10PR est de type aspartique et n'est active que sous forme de dimère p10-p10. Chaque monomère contient un domaine DTG caractéristique des protéases aspartiques cellulaires. Cependant, ces dernières sont monomériques et renferment les deux motifs sur la même molécule.

La Transcriptase Inverse ou RT (*Reverse Transcriptase*): p66RT-p51. Le clivage du précurseur Pr160gag-pol produit des sous-unités p66 qui se dimérisent en p66-p66, une forme enzymatique peu active. Une des sous-unités de l'homodimère est clivée en C-terminal pour engendrer un fragment de 51 kD. L'hétérodimère p66-p51 résultant est la forme active de la transcriptase inverse qui possède trois types d'activités enzymatiques: ADN polymérase-ARN dépendante, ADN polymérase-ADN dépendante et Ribonucléase H (RNase H). L'activité polymérasique est liée à la portion N-terminale de p66, tandis que l'activité RNase H est due à la portion C-terminale. Ces deux domaines sont séparés par une région d'attache. En outre, la RT fixe spécifiquement du tRNA-Lys3 qui est l'amorce préférentielle pour la rétrotranscription.

L'Intégrase p31IN est le fragment C-terminal de la polyprotéine Pr160gag-pol qui possède:

- un domaine N-terminal HH-CC Zinc-finger.
- un motif D-35-E impliqué dans l'activité catalytique ainsi que la formation de polymère de p31IN qui est la forme active de l'enzyme.

-un domaine de liaison au DNA, impliqué dans le 3'-DNA processing.

L'intégrase participe au transfert vers le noyau du DNA proviral dont elle est responsable de l'intégration au DNA chromosomique à des sites aléatoires. C'est une enzyme de la superfamille des polynucléotidyl-transférases.

2.3-Gène *env* (enveloppe).

Ce gène code pour la polyprotéine glycosylée gp160 qui est secondairement clivée, entre l'arginine 511 et l'alanine 512, par une protéase cellulaire liée à la membrane plasmique (167). On obtient les deux glycoprotéines d'enveloppe qui demeurent cependant liées de façon non covalente: la glycoprotéine externe gp120SU et la glycoprotéine transmembranaire gp41TM.

La gp120SU est très repliée et constituée d'une alternance de domaines conservés (C1-C5) et hypervariables (V1-V5) (figure 4). Les premiers sont impliqués dans les interactions avec le récepteur CD4 et la partie externe de la gp41. Les seconds, notamment la boucle V3, induisent la production d'anticorps neutralisants auxquels les virus échappent progressivement du fait de la variabilité antigénique.

La gp41TM possède un domaine C-terminal interne, un domaine transmembranaire d'ancrage TM, et deux domaines dans la partie N-terminale externe : le peptide de fusion F, et la région ZP (*Leucine Zipper*) qui interagit avec la gp120.

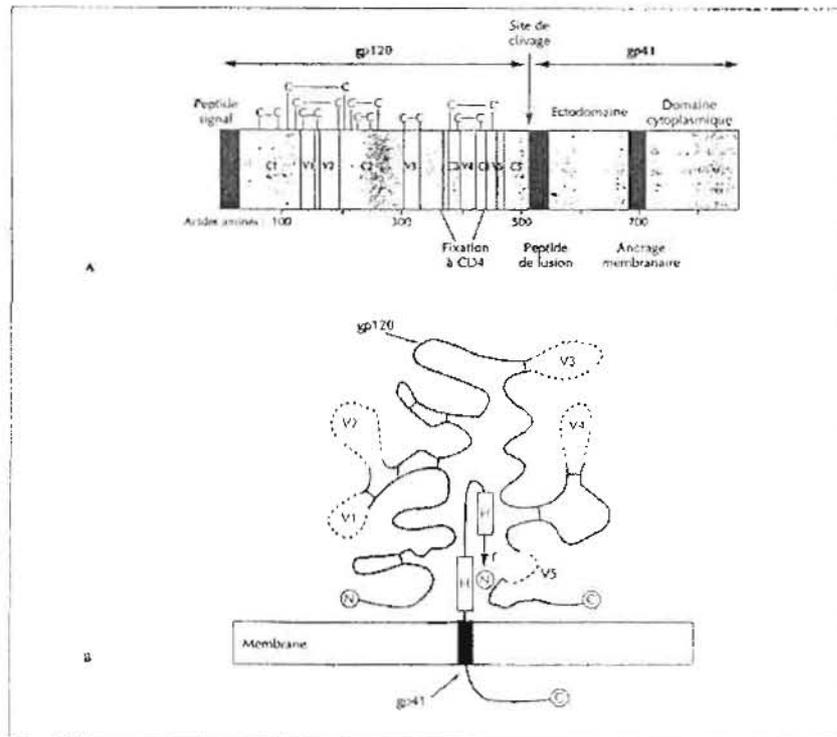


Figure 4 : Protéines d'enveloppe du VIH-1 (7).

A. Domaines fonctionnels des glycoprotéines gp120 et gp41. Le peptide signal est clivé lors de la maturation. Dans la gp120 sont indiqués les domaines conservés (C1 à C5) et variables (V1 à V5), ainsi que les ponts bisulfures impliqués dans la structure tertiaire de la molécule.

B. Schéma du complexe gp120/gp41, avec les différentes boucles de la gp120, ainsi que le peptide de fusion F et les domaines en hélice α de la gp41.

3-Gènes de régulation du VIH-1.

3.1-Gène *tat* (trans-activator of transcription).

Ce gène formé de deux exons code pour la **protéine p16tat**, ainsi qu'une deuxième **protéine p14tat1**, correspondant au premier exon et également fonctionnelle.

La protéine *tat* s'accumule dans le nucléole de la cellule hôte. C'est un trans-activateur de la transcription des gènes du VIH qui se fixe sur le renflement UCU de la séquence TAR (*Trans-Activation Responsive region*) située à l'extrémité 5'

des ARNm viraux, par l'intermédiaire d'un domaine basique riche en Arginine. Cette fixation est précédée de celle de certains facteurs cellulaires sur la boucle de TAR (9). Elle permet la stabilisation des complexes de transcription et l'élongation des ARNm viraux. Il y a augmentation du niveau basal de transcription.

La protéine tat peut également:

-activer la transcription des ARNm viraux de façon TAR-indépendante, notamment au niveau du système nerveux central (318).

-modifier la transcription de gènes cellulaires, en se liant soit à des facteurs de transcription au niveau des promoteurs, soit à des séquences ARN TAR-like (48, 99, 158, 346). Cette propriété serait en partie liée au rôle de la protéine tat dans le développement de la maladie de Kaposi.

-induire, sous sa forme extracellulaire, l'apoptose de lymphocytes T4 non infectés et contribuer ainsi à l'installation de l'immunodéficience (119, 189).

3.2-Gène rev (regulator of expression virion protein).

Il code pour la **phosphoprotéine pp20rev** qui s'accumule dans le nucléole de la cellule-hôte, et qui intervient dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes de structure en assurant le transport des transcrits primaires ou mono-épissés du noyau au cytoplasme.

La protéine rev se fixe sur les ARNm au niveau de la région RRE (*Rev Responsive Element*) correspondant à une séquence du gène *env*. L'interaction a lieu entre la deuxième boucle de la structure secondaire du RRE et un domaine de pp20rev riche en arginine, situé dans la première moitié de la partie codée par le deuxième exon, comprenant les aa 35 à 50 (RQARRNRRRRWRERQR). La fixation s'accompagne de la polymérisation de la protéine grâce à un domaine riche en leucine, constitué des aa 75 à 84 (LPPLERLTD). Ce domaine est par ailleurs responsable d'interactions avec des protéines cellulaires impliquées dans les transports nucléo-cytoplasmiques, notamment la protéine nucléolaire B23 (100), le

facteur d'initiation de la traduction 5A (287) et les nucléoporines (36, 102).

3.3-Gène nef (negative expression factor, ancien 3'ORF).

Il code pour la **protéine p27nef**, myristylée sur le résidu glycine en position 2, et qui est présente dans le cytosol majoritairement, sur la face interne de la membrane plasmique à laquelle elle est liée par l'intermédiaire du radical myristyle, et accessoirement dans le nucléole. Elle intervient principalement dans les processus suivants:

- la régulation négative de l'expression du récepteur CD4 dont elle induit la pinocytose et la dégradation ultérieure dans les lysosomes (109).
- l'augmentation de l'infectivité et de la production de virions (216).
- l'interaction avec certaines kinases cellulaires (291).
- l'inhibition de la synthèse protéique (264).
- l'induction de la pinocytose des molécules HLA classe I (297).

3.4-Gène vif (viral infectivity factor, ancien Sor ou O).

Il code pour la **protéine p23vif** retrouvée surtout dans le cytosol et la face interne de la membrane plasmique. Elle a un rôle:

- essentiellement dans le processus de maturation des virions dont dépend le pouvoir infectieux.
- dans la synthèse d'ADN proviral et une étape précédant l'intégration (38, 341).

La région C-terminale est nécessaire à la stabilité de la liaison de la protéine vif aux membranes. Elle est également importante pour les fonctions de cette protéine, à l'instar des régions conservées situées entre les aa 103 à 115, et 142 à 150 (117).

3.5-Gène vpr (viral protein R).

Ce gène code pour **la protéine p14vpr**, protéine de régulation de 96 aa qui est retrouvée en quantité relativement importante dans les virions où elle est associée à la p6gag, dans le noyau de la cellule hôte et le plasma des sujets infectés. Elle joue un rôle dans :

- le transport du complexe de pré-intégration, conjointement à la protéine p17MA, du cytoplasme au noyau des cellules même au repos.

- des perturbations métaboliques diverses : inhibition de la prolifération cellulaires, induction de la différenciation cellulaire, transactivation de gènes cellulaires (122).

- la régulation de la production virale et de la latence (188).

L'incorporation de la protéine vpr dans le virion nécessite le précurseur Pr55gag auquel elle se lie. Cette liaison a lieu entre le domaine formé par les aa 1 à 46 de la zone p6gag et un domaine hautement conservé formant une hélice-alpha au niveau des aa 17 à 34 (201).

Remarque: chez le VIH-2 et certains SIVs (Sm, Mnd2, Rcm) , un gène supplémentaire appelé *vpx* produit une protéine similaire à la protéine p14vpr, et qui est également retrouvée dans le virion. Cependant, ses fonctions et ses relations avec vpr ne sont pas bien élucidées. Ce gène *vpx* pourrait résulter d'une duplication de *vpr* (325).

3.6-Gène vpu (viral protein U).

Ce gène, retrouvé uniquement chez le VIH-1 et le SIVcpz, code pour **la phosphoprotéine pp16vpu** de 81 aa et résultant de la traduction d'un ARNm bicistronique *vpu/env* (298). La phosphorylation, nécessaire à l'activité biologique, a lieu sur les résidus sérine 52 et 56, grâce à la caséine kinase II. Cette protéine de régulation s'ancre dans la membrane plasmique par son extrémité N-terminale hydrophobe. Deux fonctions biologiques principales lui sont attribuées :

- dégradation des molécules de CD4, glycoprotéine transmembranaire de 58 kD

dont le domaine cytoplasmique, aa 402 à 426, interagit avec le domaine C terminal de la protéine vpu. La dégradation concerne aussi bien le CD4 membranaire que celui complexant la gp160 dans le réticulum endoplasmique.

-stimulation du bourgeonnement et de la libération des virions VIH. Cette fonction serait liée à la polymérisation de la protéine, avec formation potentielle d'un canal ionique qui influencerait le pH intracellulaire (202).

-contribution à la réduction des effets cytopathogènes du VIH-1 (353).

4-Séquences LTR (Long Terminal Repeat).

4.1-LTR 5'.

Il est l'équivalent des régions promotrices des gènes cellulaires chez les rétrovirus (103), sauf le Spumavirus foamy pour lequel un promoteur interne a été caractérisé (193). Les différents éléments fonctionnels du LTR 5' du VIH-1 sont répartis dans trois régions : région modulatrice, région "core" et région TAR.

4.1.1-Région modulatrice.

Elle contient des éléments de régulation comme le NRE (*Negative Regulatory Element*), et des sites de liaison pour des facteurs de transcription cellulaires, dont les principaux sont:

-l'**AP-1 (Activator Protein)** dont le rôle dans la régulation de l'expression des gènes du VIH reste à établir.

-le **COUP (Chicken Ovalbumine Upstream Promotor)** qui se fixe sur un élément de régulation négative (69).

-le **NF-AT (Nuclear Factor for Activated T-cells)** se fixe sur des sites riches en purines et semble être un facteur de régulation négative de la transcription. Mais un facteur de régulation positive, l'**IBF (Interleukin Binding Factor)**, peut également se fixer sur ces mêmes sites (190).

-l'**USF** (*Upstream Stimulatory Factor*) est un facteur de régulation négative.

-le **TCF-1a** (*T-Cell Factor*) spécifique des lymphocytes T et dont le site de fixation est dupliqué dans certaines isolats de VIH.

-le **NF-κB** (*Nuclear Factor-Kappa B*) possède deux sites de liaison, tous importants pour l'activité promotrice du LTR 5', et qui constituent les séquences stimulatrices ou *Enhancers*.

4.1.2-Région "core".

Elle contient des éléments intervenant dans la transcription basale, notamment:

-**trois sites de fixation du facteur Sp-1** situés en amont de la TATA-box. Ce sont des motifs de séquence riches en GC. Le facteur Sp-1 régule d'autres facteurs de transcription cellulaires et interagit avec la protéine Tat.

-la **TATA-box** interagissant avec des facteurs généraux de transcription comme le facteur TBP (*TATA Binding Protein*), les TAF (*TATA-Associated Factors*) et l'UBP-1 (*Untranslated Binding Protein*).

-la **séquence INT**, située entre la TATA-box et la région TAR. Elle lie aussi bien des facteurs de régulation que des facteurs de transcription basale.

4.1.3-Région TAR.

Elle commence au site d'initiation de la transcription des gènes du VIH, et s'étend sur une soixantaine de nucléotides en aval. Elle joue un rôle important dans la transcription. En effet, le transcrit TAR-ARN, qui se trouve au début de tous les ARNm viraux, est indispensable à la transactivation de la transcription effectuée par la protéine tat. Cette dernière doit se fixer sur la structure "bulge" de ce TAR-ARN. Par ailleurs, le TAR-ADN renferme :

-l'élément régulateur **IST** (*Inducer of Short Transcripts*) responsable de la transcription de courts ARN qui "séquestreraient" la protéine tat (300).

-des sites de liaison pour des facteurs cellulaires.

4.2-LTR 3'.

Il est structurellement identique au LTR5', mais est différent sur le plan fonctionnel : seuls les éléments de terminaison et de polyadénylation des ARN messagers sont utilisés.

VI-MODES DE TRANSMISSION DU VIH.

1-Transmission par le sang et dérivés.

1.1-Transfusion sanguine.

Le dépistage systématique de l'infection à VIH chez les donneurs de sang, obligatoire dans tous les pays, a ramené le risque de contamination post-transfusionnelle aux cas exceptionnels suivants:

-période de fenêtre sérologique précédant la séro-conversion du donneur. La PCR peut permettre d'éliminer ce risque résiduel, mais sa systématisation en pratique transfusionnelle est si lourde qu'elle n'est pas envisagée, même dans les pays développés.

-erreurs techniques éventuelles : faux négatif du fait d'une mauvaise exécution ou d'une détérioration du test, erreurs d'identification. Ceci impose le respect rigoureux des bonnes pratiques de laboratoire par des techniciens bien formés. Il faut s'assurer également du maintien de la chaîne de froid, surtout dans nos pays chauds.

Dans la plupart des pays, une sélection des donneurs de sang bénévoles est opérée en amont pour écarter les personnes à risque, grâce à un interrogatoire incluant des renseignements relatifs aux maladies et aux moeurs sexuelles. Mais en Afrique, l'avènement du SIDA a réduit significativement le nombre de ces bénévoles, d'où le recours quasi-systématique aux donneurs familiaux avec lesquels aucun tri n'est généralement opéré avant les résultats sérologiques.

1.2-Toxicomanie par voie injectable.

Les échanges de seringues souillées entre drogués est le mode majeur de contamination dans cette communauté, véritable groupe à risque dans les pays développés. La toxicomanie par voie injectable a été rapportée dans au moins 80 pays en voie de développement (313), mais elle reste généralement limitée aux grands centres urbains des pays producteurs de drogues et des pays africains de « transit ».

Les principales mesures de prévention de la propagation de l'infection à VIH dans ce milieu marginal consistent à distribuer gratuitement des seringues à usage unique et à la prise en charge psycho-sociale des drogués dans des centres spécialisés.

1.3-Piqûre ou coupure accidentelles par du matériel souillé.

Les Accidents d'Exposition au Sang (AES) surviennent surtout en milieu professionnel : personnel soignant et personnel de laboratoire. Une sérologie immédiate doit être effectuée pour s'assurer de l'absence d'une séropositivité antérieure à l'incident. D'autres épreuves seront réalisées ultérieurement pour confirmer ou non la contamination accidentelle. Parallèlement, un traitement à l'AZT, ou mieux une trithérapie antirétrovirale, peut être instauré pour contrecarrer toute évolution de l'infection. La législation en la matière n'existe pas toujours dans nos pays, notamment en ce qui concerne la prise médicale effective. Parfois, l'événement contaminant peut passer inaperçu ou être négligé par la personne concernée, d'où la nécessité d'un respect strict des consignes de sécurité relatives aux actes de soins et de laboratoires.

Le risque de contamination concerne aussi les patients soignés, particulièrement lorsqu'il s'agit d'injections. Selon *Giesselquist et al (114)*, la notion d'injections serait retrouvée dans 20 à 40% des cas d'infection à VIH en Afrique Subsaharienne, mais ce taux ne serait que de 2,5% selon le rapport de consultation d'un groupe d'experts de l'ONUSIDA/OMS rendu public le 14 mars 2003

(www.unaids.org/whatsnew/press/frn/HIV_injections140303_fr.html).

Comme autres situations exposant à ce type de risque, on peut citer un certain nombre d'actes tels que : la circoncision, le tatouage, le rasage avec des instruments souillés. Le risque important lié à ces actes largement pratiqués en Afrique a nécessité des actions spécifiques de Communication pour le Changement de Comportement en matière de VIH/SIDA pour les coiffeurs et autres barbiers traditionnels. Il faut rappeler par ailleurs que des études ont montré le rôle bénéfique de la circoncision dans la réduction du risque de contamination sexuelle de l'homme (266), mais elle ne dispense évidemment pas du préservatif (36).

2-Transmission par voie sexuelle.

C'est actuellement le mode de transmission le plus fréquent et le plus difficile à contrôler, car lié au comportement humain. Selon les mêmes experts précédents, en Afrique Subsaharienne, la modélisation de l'épidémie du SIDA basée sur les meilleures données épidémiologiques disponibles montre que les contaminations sont très majoritairement dues à des rapports sexuels non protégés. Les professionnelles du sexe jouent un rôle central dans la diffusion du virus dans la population. C'est le groupe cible qui possède le taux d'infection à VIH le plus élevé dans tous les pays, avec des séroprévalences pouvant atteindre 75% (223) . En plus du renforcement de la sensibilisation de ces femmes et de leurs clients sur l'usage indispensable du préservatif, il faut améliorer l'accessibilité aux soins par la création de centres réellement équipés pour le dépistage et le traitement des IST. A cet égard, l'exemple du suivi de la cohorte dakaroise est à souligner.

Les moyens de prévention à l'échelle individuelle demeurent la fidélité réciproque du couple, l'abstinence, le recours au préservatif pour les rapports sexuels occasionnels. Le respect de cette dernière mesure, pour des raisons culturelles et/ou religieuses, n'est pas encore systématique, malgré les campagnes de sensibilisation sur les risques de contamination.

3-Transmission mère-enfant.

Une mère infectée par le VIH peut le transmettre à son enfant pendant la grossesse, durant l'accouchement, ou au cours de l'allaitement. Différentes études de part le monde ont montré que cette transmission n'est pas systématique. Le risque de contamination de l'enfant varie de 15 à 35%, en dehors de toute intervention médicale (228). Il est plus élevé pour le VIH-1 que pour le VIH-2. Il est plus important dans les pays en développement, notamment en Afrique, du fait de facteurs additionnels d'exposition comme l'allaitement maternel non contre-indiqué.

La transmission *in utero* se ferait par l'intermédiaire des cellules macrophagiques placentaires, plutôt que par les cellules trophoblastiques qui ne sont pas réceptives au VIH (137, 213). Des virions ou des cellules infectées pourraient traverser passivement les infractions de la membrane syncytiotrophoblastique au cours des échanges sanguins foeto-maternels. Ces derniers sont très intenses en fin de grossesse, notamment pendant le travail et la délivrance.

Le risque de contamination lors du passage dans la filière génitale semble plus grand que celui encouru *in utero*, comme l'attestent certaines observations :

- absence quasi-constante de signes cliniques et biologiques liés à une répllication virale *in utero* chez le nouveau-né de mère séropositive (31).

- risque de contamination significativement plus élevé chez le premier enfant issu d'une grossesse gémellaire (116).

- la recherche de provirus par PCR dans les cellules thymiques foetales a montré que moins de 2% de foetus sont infectés (43).

- la détection du virus sur des prélèvements effectués à la naissance montre 40% de bébés positifs, la positivité chez les autres enfants infectés n'étant révélabale que plus tard (49).

- les données virologiques chez 95 enfants infectés ont permis à Rouzioux *et al*

(283) de conclure à une contamination *in utero* que dans un tiers des cas, le reste étant des cas d'infection acquise à la naissance.

C'est au cours de l'accouchement que s'ajoutent d'autres facteurs de risque : contact direct avec le sang et les sécrétions cervico-vaginales contenant des virions et des cellules infectées, déglutition éventuelle de produits infectieux.

Quant au risque de contamination par l'allaitement maternel, il est proportionnel à la durée de celui-ci (312), mais est beaucoup plus élevé durant les premiers jours du fait de la richesse relative du colostrum en virions libres et lymphocytes infectés (281, 332, 333). Il a été récemment rapporté la possibilité d'avoir dans le lait maternel une population virale différente des virus du sang périphérique (27).

D'autres facteurs augmentent le risque de transmission verticale du VIH:

-la baisse du taux de lymphocytes CD4+ maternels. Ainsi, *Mayaux et al* (211) ont rapporté un risque de 43% quand ce taux est inférieur à 200 cellules/mm³, contre seulement 15% pour des taux supérieurs à 600 cellules/mm³.

-la positivité de l'antigénémie p24 ou une charge virale élevée (39, 211, 345).

Des mesures préventives sont préconisées aux mères séropositives :

-les résultats de l'essai thérapeutique franco-américain ACTG-076/ANRS-024, publiés en 1994, ont montré que la prise d'AZT peut permettre de réduire d'environ deux tiers le risque de transmission verticale (68). L'AZT est administrée aux séropositives asymptomatiques pendant la grossesse, entre la 14ème et la 24ème semaine d'aménorrhée, ainsi qu'au nouveau-né jusqu'à l'âge de 6 semaines. La névirapine est également utilisée.

-les lavages vaginaux avec des produits virucides juste avant l'accouchement pour éviter la contamination par les sécrétions maternelles.

-le renoncement éventuel à la procréation.

V-CYCLE DE MULTIPLICATION.

1-Tropisme cellulaire du VIH.

Le VIH possède diverses cellules cibles *in vivo* (tableau III). La plupart d'entre-elles présentent à leur surface la molécule CD4, le récepteur principal. Cependant, l'infection des cellules sans CD4 peut se réaliser. En effet, des variants viraux CD4-indépendants ont été décrits pour le VIH-1 (87), mais ils sont beaucoup plus fréquents pour le VIH-2 (271).

TISSU	CELLULES-CIBLES
Hématopoïétique	Hématopoïétique, Lymphocytes T4, Macrophages, Promyélocytes Cellules dendritiques, Eosinophiles
Cérébral	Microglie, Cellules endothéliales capillaires, Astrocytes, Cellules gliales, Macrophages
Cutanée	Cellules de Langerhans
Gastro-intestinal	Cellules épithéliales, Cellules entérochromaffines, Macrophages Lymphocytes de la lamina propria
Pulmonaire	Fibroblastes, Cellules de l'épithélium sinusoidal
Rénal	Cellules épithéliales

Tableau III: Tropisme cellulaire du VIH. D'après Chen-Mayer (61).

Depuis 1996, des co-récepteurs du VIH ont été identifiés (79, 83, 87, 98). Ce sont des récepteurs de certaines chimiokines (figure 5), notamment :

-le CXCR4, anciennement appelé Fusine, récepteur de la CXC-chimiokine SDF-1 (*Stromal cell-Derived Factor*).

-le CCR5, récepteur des CC-chimiokines RANTES (*Regulated or Activation Normal T-Expressed and Secreted*) et MIP (*Macrophage Inflammatory Protein*) 1 α et 1 β .

Ces co-récepteurs sont nécessaires à la fusion permettant l'entrée du virus dans la cellule hôte.

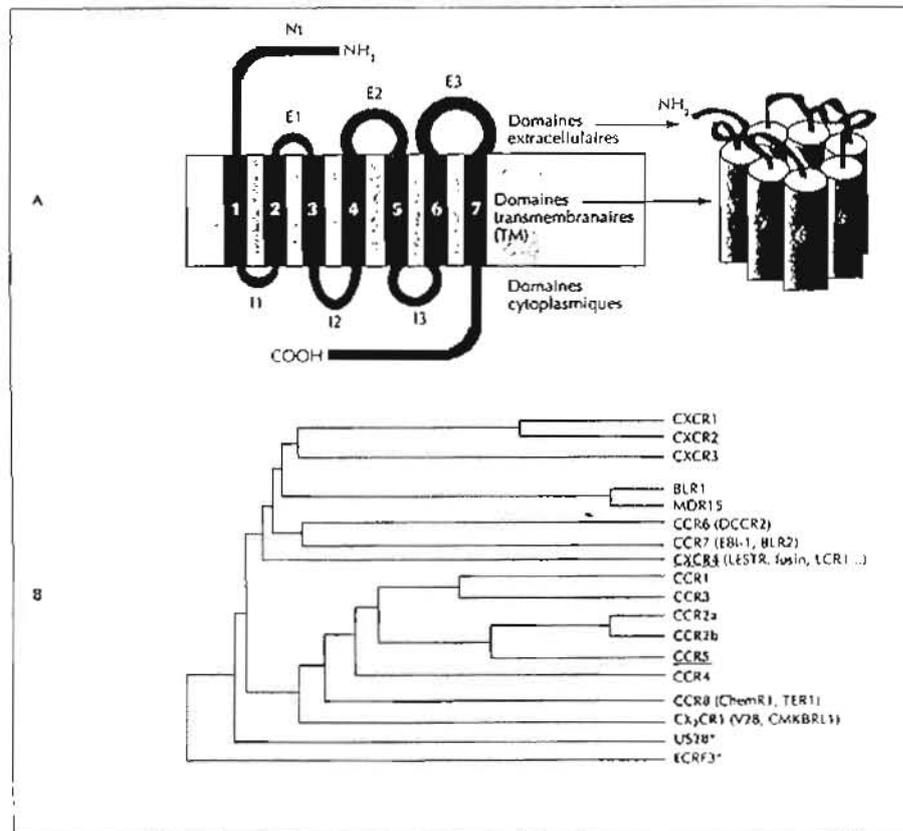


Figure 5: Récepteurs de chimiokines (7).

A. Schéma de l'organisation des récepteurs à 7 domaines transmembranaires ou récepteurs 7TM.

B. Dendrogramme montrant les similarités de séquences protéiques entre les principaux récepteurs de chimiokines et les récepteurs orphelins apparentés. Les molécules ayant une activité de corécepteur de VIH sont : **CCR5**, **CXCR4**, **CCR3**, **CCR2b**, **CCR8**, **CX3CR1**, **US28** (exprimé par le cytomégalovirus humain). *Origine virale.

D'autres molécules membranaires peuvent fixer le VIH-1 :

-le galactosylcéramide, glycolipide des cellules nerveuses ou épithéliales (127, 350) qui favorise en particulier l'infection des astrocytes (CD4-) cérébraux (21).

-le DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Nonintegrin*), une

protéine membranaire des cellules dendritiques (111, 310). Cette lectine calcium-dépendante joue un rôle dans la trans-infection des muqueuses d'où les cellules dendritiques fixent les virions VIH-1 pour les acheminer vers les cellules cibles CD4+/corécepteurs+ des tissus lymphoïdes (ganglions lymphatiques afférents). Elle est aussi un récepteur pour d'autres agents pathogènes comme le SIV du macaque (355), le cytomégalovirus humain (125), le Filovirus Ebola (192) et *Mycobacterium tuberculosis* (164).

-le DC-SIGNR (*Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Nonintegrin-Related*), protéine membranaire homologue de la précédente et présente au niveau des cellules endothéliales qui permettent aussi la trans-infection (262).

-les HSPG (*Heparin Sulfate Proteoglycans*) (234, 280).

2-Etapes du cycle de multiplication.

2.1-Attachement-Fusion-Pénétration.

L'attachement du virion à la membrane plasmique de la cellule cible est réalisé grâce à l'interaction entre le récepteur CD4 et la glycoprotéine de surface du VIH (gp120 ou gp125). Le site de liaison à ce récepteur est formé par plusieurs domaines assez conservés et non contigus, mais juxtaposés par le repliement de la glycoprotéine qui subit un changement conformationnel lui permettant d'interagir ensuite avec le co-récepteur. Cette deuxième interaction conduit à l'ancrage de la glycoprotéine transmembranaire (gp41 ou gp36) dans la membrane plasmique. Il s'en suit une fusion entre cette dernière et l'enveloppe virale qui aboutit à la pénétration du virus dans la cellule.

Pour l'infection CD4-indépendante, le site de fixation au co-récepteur est directement accessible (figure 6).

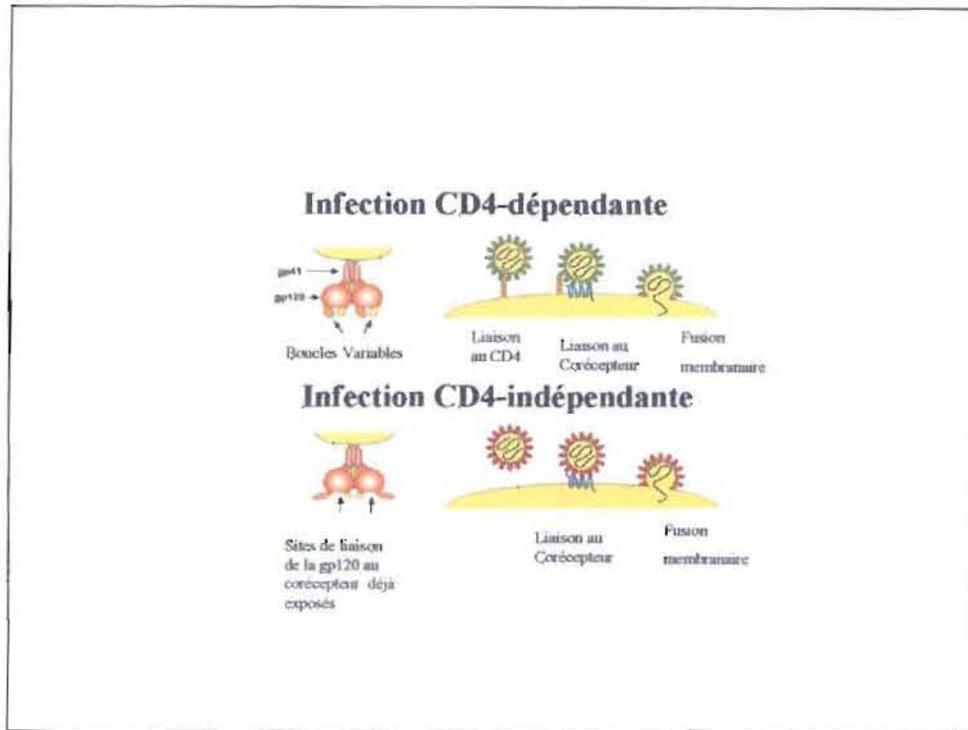


Figure 6 : Attachement-Fusion-Pénétration du VIH-1 pour les infections CD4-dépendante et CD4-indépendante. Dans le second cas, le site de fixation de la gp120 au corécepteur ne nécessite pas la fixation préalable du virion au CD4 pour être exposé et permettre la liaison.

2.2-Rétrotranscription du génome viral.

C'est l'étape cytoplasmique majeure du cycle de multiplication du VIH. Elle a lieu dans la capsidie partiellement dégradée. Cependant, la mise en évidence d'ADN proviral associé à des virions purifiés à partir du milieu de culture ou du plasma (329), conduit à penser que la rétrotranscription peut débuter dans le virion libre. Elle se déroule de la façon suivante :

- appariement de 18 nucléotides de l'extrémité 3' de l'ARN^tLys3 servant d'amorce avec la séquence complémentaire PBS (*Primer Binding Site*) en aval de la région u5 du génome.

- synthèse de l'ADN(-) complémentaire de la séquence des régions u5 et r de l'extrémité 5' du génome, grâce à la RT.

- hydrolyse du fragment **r-u5** d'ARN par l'activité RNase H de la RT.
- appariement de la région **r** de l'extrémité 3' de l'ARN avec sa séquence complémentaire **R** sur le fragment d'ADN (-) formé.
- poursuite de la rétrotranscription jusqu'à l'obtention de la région **pbs**.
- hydrolyse du segment **u3-r** à l'extrémité 3' de ARN, et synthèse d'un segment d'ADN (+) : **5'-U3-R-U5-PBS-3'**.
- appariement de la séquence **PBS** de cet ADN(+) avec celle d'un brin d'ADN(-), et synthèse des parties complémentaires de façon à obtenir un ADN proviral double brin ayant aux deux extrémités une séquence **U3-R-U5** ou **LTR**.

Cet ADN proviral doit être acheminé ensuite dans le noyau où il va s'intégrer au génome cellulaire. Les principales étapes de la rétrotranscription sont schématisées dans la figure 7.

2.3-Transfert dans le noyau et intégration de l'ADN proviral.

L'ADN proviral est transporté de façon active du cytoplasme au noyau grâce aux protéines virales p17MA et p14vpr qui lui sont associées sous forme d'un complexe de pré-intégration incluant l'intégrase. Des protéines cellulaires de transport nucléaire interviennent également. L'intégrase, comme son nom l'indique, assure les réactions d'intégration de l'ADN proviral dont elle clive d'abord deux nucléotides à chaque extrémité 3'. Il y a ensuite clivage de l'ADN chromosomique, insertion du provirus par ligation de ses LTR aux extrémités de l'ADN cellulaire. Des enzymes cellulaires participent au parachèvement du processus. Le site d'intégration, dont pourrait dépendre la production virale, ne semble pas être quelconque. Ainsi, une préférence pour le voisinage des séquences transposables a été rapportée (299). Par ailleurs, les molécules d'ADN proviral clivées peuvent se circulariser, ce qui réduit le nombre de copies intégrées par cellules.

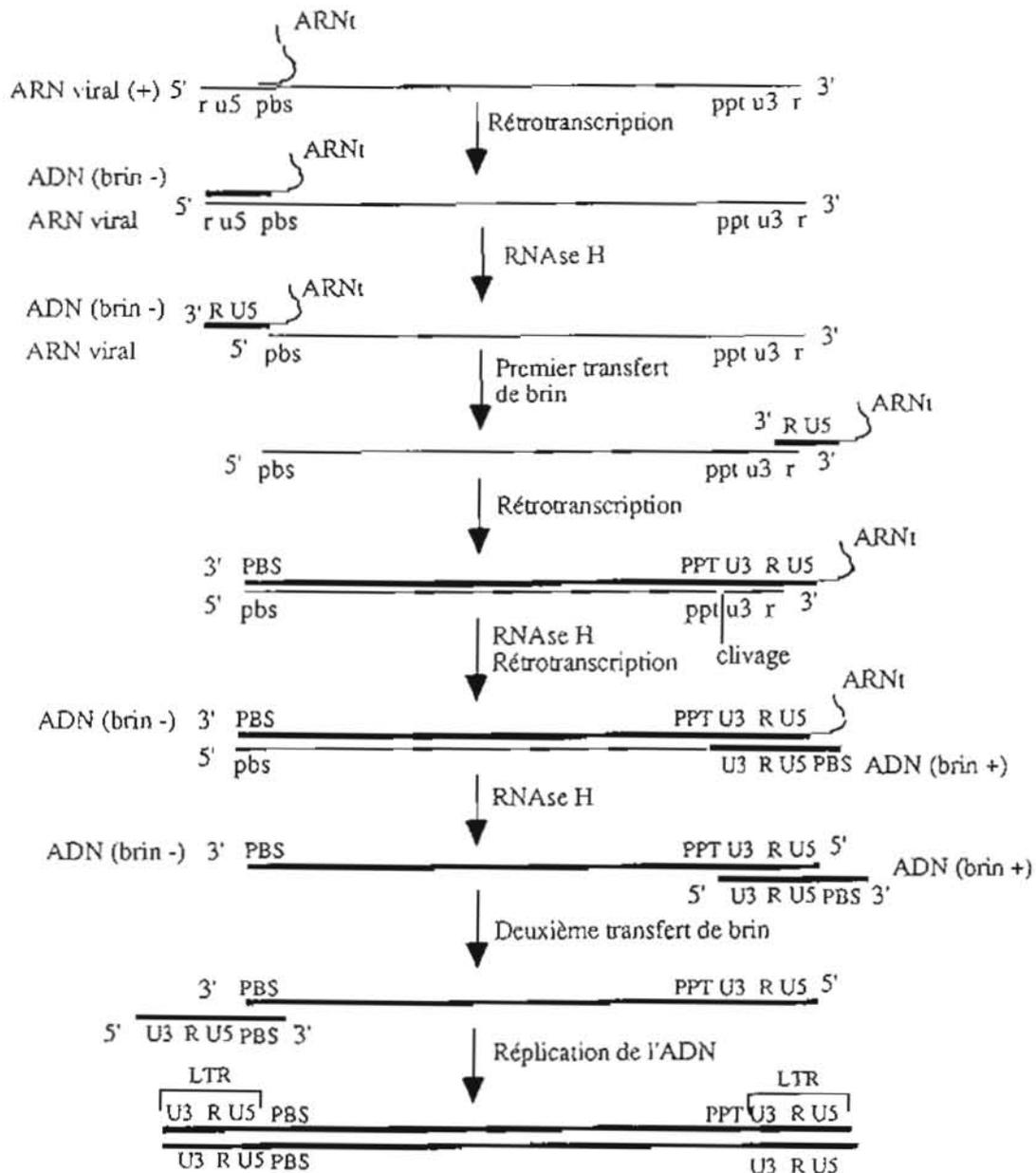


Figure 7 : Rétrotranscription du génome en ADN proviral (268).

2.4-Expression des gènes viraux.

Une fois intégré, le provirus se comporte comme un gène cellulaire et interagit à son profit avec les facteurs de transcription cellulaires.

L'activation cellulaire transmembranaire déclenche une cascade d'événements transductionnels conduisant à la libération du NF- κ B de son inhibiteur

cytoplasmique I- κ Ba. Après sa transduction nucléaire, ce NF- κ B se fixe sur l'*enhancer* et interagit avec d'autres facteurs cellulaires. Ces interactions stimulent le promoteur et conduisent à l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II cellulaire, au début de la région TAR. Il y a production de transcrits primaires équivalents à l'ARN génomique qui subiront des épissages alternatifs. On obtient d'abord les messagers multi-épissés précoces codant pour les protéines de régulation tat, rev et nef.

La protéine tat néoformée regagne le noyau pour transactiver la transcription virale basale et amplifier ainsi la production des différents messagers viraux.

La protéine rev, présente en quantité suffisante, assure le transport vers le cytoplasme des ARNm génomiques et mono-épissés. Elle favorise ainsi l'expression des autres protéines virales dites tardives, celles dont les messagers contiennent le motif RRE : gag, pol, vif, vpr, env et tat (domaine tat I).

Divers processus de maturation post-traductionnelle surviennent avant ou pendant la formation du virion: phosphorylation, myristylation, dimérisation, glycosylation, clivages.

2.5-Assemblage et Maturation du Virion.

La formation du virion est initiée par l'auto-assemblage des molécules du précurseur Pr55gag au niveau de la face interne de la membrane plasmique, dans une zone où sont exprimées les glycoprotéines d'enveloppe. Pr55gag interagit avec cette membrane grâce au radical myristyle et au domaine N-terminal de la protéine p17MA. Quelques molécules du précurseur Pr160gag-pol suivent le même processus et se trouvent incorporées dans le virion naissant. Sont également incorporées :

- deux copies d'ARN génomique associées aux amorces ARNt Lys3.
- quelques molécules de vif, vpr, nef.
- des protéines cellulaires, en quantité plus faible mais pouvant influencer

l'infectivité virale: cas de la cyclophiline A.

-des nucléotides-phosphates, dont la disponibilité rend possible une certaine activité retro-transcriptionnelle dans certains virions matures, matérialisée par la mise en évidence d'ADN proviral associé aux virions purifiés.

A la fin du bourgeonnement, la maturation de la particule virale libérée nécessite le clivage ordonné des précurseurs Pr55gag et Pr160gag-pol. Cette étape finale est effectuée par la Protéase virale dont l'activité enzymatique est déclenchée par la dimérisation de Pr160gag-pol.

VI-PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFECTION A VIH.

A partir du contagé, l'infection à VIH évolue en trois phases:

-une phase de primo-infection au cours de laquelle une réponse immune spécifique tente de contrôler l'importante virémie qui suit le contagé.

-une phase de latence clinique, longue période pendant laquelle, malgré une réponse à priori efficace, le virus va poursuivre sa multiplication et sa dissémination dans l'organisme, rompant progressivement l'équilibre en sa faveur.

-une phase cliniquement symptomatique aboutissant à la déchéance du système immunitaire, donc au SIDA.

1.Phase de primo-infection (30, 128).

Une fois dans l'organisme, le virus va se multiplier activement dans les organes lymphoïdes secondaires : rate, ganglions lymphatiques. Rapidement, apparaît une virémie considérable mais vite réprimée et ramenée à un niveau nettement plus bas, du fait d'interactions largement en faveur du système immunitaire.

En effet, une intense réactivité lymphocytaire T cytotoxique polyclonale se développe et va persister au moins jusqu'au début du stade IV clinique (242, 289,

362), pour ensuite disparaître probablement par épuisement clonal (42). Ces lymphocytes T cytotoxiques ou CTL (*Cytotoxic T Lymphocyte*) peuvent induire des effets immunopathologiques contribuant au déficit immunitaire, car ils sont dirigés contre d'autres cellules immunitaires, en l'occurrence celles qui expriment les antigènes viraux : lymphocytes CD4+, macrophages et cellules dendritiques infectés. Le système HLA de l'hôte semble jouer un rôle dans l'efficacité de la réponse CTL. Ainsi certains phénotypes comme HLA B*57, HLA B*39 et HLA A*30-Cw*07 sont associés à une faible charge virale, donc favorables à un meilleur contrôle de l'infection à VIH (317).

Les anticorps anti-VIH circulants n'apparaissent qu'après le début de la réactivité CTL, mais persistent à des taux élevés en général. Ils sont détectables entre 3 et 12 semaines après le contage. Les anticorps neutralisants sont dirigés contre les domaines variables V3 (surtout) et V1/V2, et/ou contre le site de fixation au CD4 qui implique les domaines conservés C2, C3 et C4 de la gp120. Leur efficacité dans le contrôle de l'infection est cependant compromise par la dérive antigénique pour le premier type, et un titre insuffisant pour le second type. Par ailleurs, des anticorps anti-gp120 (d'autres épitopes de la gp120) et anti-gp41 peuvent médier une lyse de cellules infectées exprimant ces glycoprotéines, par le mécanisme de cytotoxicité dépendante des anticorps ou ADCC (*Antibody Depending Cellular Cytotoxicity*).

2.Phase de latence clinique.

Cette phase ne correspond nullement pas à une période de latence virale. En effet, la charge virale sanguine demeure importante puisque :

- 1 à 10% des cellules mononucléées du sang périphérique hébergent le provirus.
- 1 à 10% de ces cellules renferment des ARNm viraux témoins d'une activité répliquative.
- la charge virale plasmatique est évaluée à plusieurs milliers de copies d'ARN viral/ml (288).

Près de 10 milliards de virions sont détruits et remplacés quotidiennement. Le *turn over* est en moyenne de 2 milliards par jour pour les lymphocytes CD4+ infectés circulants (136, 253). Ces derniers représentent plus de 99% des cellules productrices des virions circulants.

Les cellules folliculaires dendritiques, les lymphocytes et les macrophages des organes lymphoïdes secondaires constituent le principal réservoir de virus pendant la latence. L'envahissement des follicules lymphoïdes par des lymphocytes T CD8+ potentiellement cytotoxiques serait impliqué dans l'involution ganglionnaire précédant le stade SIDA.

Durant cette phase de latence clinique, le VIH prend très progressivement le dessus sur le système immunitaire, grâce à **plusieurs mécanismes**:

→ **Induction progressive d'une réponse CTL inappropriée, déplétion et dysfonctionnement des lymphocytes CD4+, par divers processus:**

-blocage de la différenciation des CTL à un stade « pré-effecteur », donc non fonctionnel, caractérisé par un faible taux de perforine (16) et/ou une faible capacité de sécrétion d'interféron γ (176).

-effets cytopathogènes directs du virus sur les lymphocytes CD4+ et sur la différenciation de leurs précurseurs ou des cellules du micro-environnement thymique.

-signaux cellulaires inadaptés conduisant à l'anergie ou à l'apoptose. Ainsi, par différents mécanismes, les protéines virales gp120, gp160, Tat, Vpr, Vpu, Nef et la protéase sont impliquées dans l'induction ou la suppression de la mort cellulaire programmée (119).

-destruction des cellules non infectées mais présentatrices d'antigènes du VIH.

-destruction des lymphocytes CD4+ circulants ayant fixé des molécules de gp120 solubles.

-induction d'auto-anticorps anti-cellules CD4+. Cela est dû aux homologues de

séquences des protéines du VIH avec des protéines humaines. Cependant, l'impact pathologique de ces auto-anticorps n'est pas établi (115).

-production par les CTL de cytokines capables de stimuler la réplication virale par activation de la cellule hôte.

→ **Modification des propriétés biologiques du VIH** relativement au tropisme, à la cinétique de réplication et à la cytopathogénicité.

→ **Variation antigénique** conduisant à une diversification virale qui aggrave l'inefficacité de la réponse immunitaire.

3-Phase symptomatique aboutissant au SIDA.

Elle survient plusieurs années après la latence clinique, et résulte de l'échec du contrôle de l'infection par le système immunitaire. Ce dernier va continuer à s'affaiblir pendant que la virémie remonte, les signes cliniques de gravité s'affirment et/ou se diversifient, alimentés par des infections opportunistes survenant ou réactivées à la faveur du déficit immunitaire.

4-Cas particuliers.

-**Sujets VIH positifs "non progressseurs" à long terme** : il s'agit d'un faible pourcentage de sujets infectés qui restent plusieurs années sans présenter d'anomalies cliniques et biologiques, en dehors de tout traitement antirétroviral (51, 237). Ils présentent des réactivités CTL anti-VIH plus fortes et persistantes, avec une plus grande activité suppressive. Les titres d'anticorps sont plus élevés, avec des anticorps neutralisants plus efficaces (129), et la charge virale habituellement plus faible.

-**Sujets exposés mais non infectés et développant une réponse CTL anti-VIH** : cas des conjointes VIH négatives dans les couples discordants et d'environ 5% de prostituées au Kenya (284) et en Gambie (286). Elles auraient pu éliminer le virus (285), mais il n'existe encore aucun cas documenté de guérison naturelle de l'infection à VIH chez l'homme ou chez l'animal (112).

La soustraction ou la réduction de l'exposition à la contamination, donc de la stimulation antigénique entretenant la réactivité CTL anti-VIH, peuvent aboutir à

une séroconversion tardive par insuffisance de cette protection immunologique (165).

-Sujets infectés séronégatifs à long terme, comme ceux décrits par *Ellenberger et al* (92) qui suggèrent un dysfonctionnement immunitaire car même le test de production d'anticorps *in vitro* par stimulation lymphocytaire au « pockweed mitogen » (ou phosphorothioate oligodéoxynucléotide) est négatif.

5- Principales différences avec l'infection à VIH-2 (K4b).

Le VIH-2 est caractérisé par une transmissibilité significativement plus basse que celle du VIH-1, tant par la voie hétérosexuelle (161, 162) que par la voie mère-enfant (1, 12). Il en est de même de la charge virale plasmatique du VIH-2 (11, 263) dont l'infection se caractérise aussi par : une plus longue durée d'incubation (au moins dix ans) (10, 280), une progression clinique plus lente vers le SIDA (204), ainsi qu'une certaine protection contre l'infection à VIH-1 (324) pas toujours retrouvée (347). Les principaux éléments de comparaison entre les types de VIH sont regroupés dans le tableau IV.

PARAMETRE	VIH-1	VIH-2
Homologie génétique	40 à 60%	
Distribution géographique	Mondiale	Afrique de l'Ouest surtout
Prévalence selon l'âge	Pic entré 20 et 30 ans	Augmente avec l'âge
Voies de transmission	Pas de différence	
Transmission hétérosexuelle	Significativement plus faible pour le VIH-2	
Transmission verticale	15 à 40%	Moins de 5%
Charge provirale (ADN)	Pas de différence	
Charge virale plasmatique	Significativement plus faible pour le VIH-2	
Délai d'évolution vers le SIDA	Autour de 10 ans	Beaucoup plus long

Tableau IV : Principaux points de comparaison entre VIH-1 et VIH-2.

VII-DIAGNOSTIC DE L'INFECTION A VIH.

1-Diagnostic clinique.

Les manifestations cliniques, liées ou non aux infections opportunistes, ne permettent qu'une présomption plus ou moins forte d'infection à VIH. Après la description des premiers cas cliniques aux USA (57) et la première définition clinique des CDC en 1982, trois classifications cliniques sont actuellement proposées (113):

-classification des CDC en 4 groupes cliniques I, II, III et IV.

-classification européenne en 3 catégories cliniques A, B et C, subdivisées chacune en 3 sous-catégories 1, 2 et 3, selon que le taux de lymphocytes CD4+ est supérieur à 500, compris entre 200 et 499, ou inférieur à 200 par mm³.

-classification de l'OMS en 4 stades cliniques 1, 2, 3 et 4.

2-Diagnostic biologique.

2.1-Diagnostic direct.

Effectué dans des situations particulières, le diagnostic direct comprend la recherche de l'antigène p24 plasmatique, la PCR spécifique et l'isolement viral.

→**Antigénémie p24.** L'antigène p24 libre est détectable avant la séroconversion et dans la phase SIDA. Le chauffage préalable du sérum libère la fraction p24 des immuns complexes circulants et permet la quantification de l'**antigénémie p24 totale**, à tous les stades de l'infection à VIH. Ce paramètre moins coûteux peut permettre un suivi biologique alternatif, car il est corrélé avec la charge virale plasmatique et le taux de lymphocytes CD4+ (311). Les nouveaux ELISA détectent simultanément les anticorps anti-VIH et l'antigène p24.

→**PCR spécifique.** La PCR Hpol est la plus utilisée pour affirmer la présence de VIH dans un prélèvement. C'est une PCR nichée qui amplifie un segment très conservé du gène *pol*, avec les amorces externes 4538/4235 et internes 4327/4461. Elle est indiquée dans le diagnostic précoce d'une transmission mère-enfant ou

d'une infection VIH avant la séroconversion, pour lever le doute avec des résultats sérologiques discordants ou dans certains dysfonctionnements immunitaires (a-gammaglobulinémie).

→ **Isolement viral.** L'isolement du VIH se fait par co-culture lymphocytaire à par des cellules mononucléées du sang périphérique du sujet infecté. La multiplication virale est détectée par la mesure de l'activité transcriptasique ou le dosage de l'antigène p24. Réservée à quelques laboratoires spécialisés, la culture ne peut se prêter au diagnostic de routine, même dans les pays industrialisés.

2.2-Diagnostic indirect.

Il repose sur la recherche d'anticorps anti-VIH circulants, grâce à des tests de dépistage et des tests de confirmation.

2.2.1-Tests de dépistage.

→ **ELISA (*Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay*) sur microplaque.** Quatre générations de tests ont été développées :

- les ELISA directs utilisant les lysats viraux comme antigènes.
- les ELISA à base des protéines recombinantes ou des peptides synthétiques.
- les ELISA utilisant les antigènes précédant avec le principe du « sandwich » pour détecter les anticorps anti-VIH totaux, IgM et IgG.
- les ELISA de 4^{ème} génération, versions améliorées des précédents, permettent la détection simultanée des anticorps et de l'antigène p24, ce qui réduit significativement la période de silence sérologique (200, 342).

→ **Tests rapides.** Ils sont basés sur le principe de l'ELISA indirect simple ou de la co-agglutination avec des particules sensibilisées.

2.2.2-Tests de confirmation.

Le Western-Blot a été le test de confirmation le plus employé. Il utilise des antigènes VIH totaux séparés par électrophorèse et transférés sur membrane de

nitrocellulose ou de nylon. Le LIA (*Line Immunoblot-Assay*) à base de peptides synthétiques et le RIBA (*Recombinant Immuno-Blot Assay*) à base de protéines recombinantes, sont de plus en utilisés. Quant au test RIPA (*Radio-Immuno-Precipitation Assay*), utilisant un lysat viral radiomarqué (cystéine S³⁵), son usage est limité à quelques laboratoires agréés pour manipuler les radio-éléments.

En général, ces tests sont utilisés comme tests de référence pour constituer des panels de sérums positifs et négatifs destinés à l'évaluation de nouveaux tests et d'algorithmes simplifiés de dépistage combinants des ELISA et/ou tests rapides.

2.3.3-Algorithmes simplifiés de diagnostic sérologique.

Des algorithmes simplifiés, tenant compte du contexte clinique ou des facteurs de risque d'infection à VIH, peuvent être mis en oeuvre. Ainsi, le diagnostic biologique peut être affirmé dans les cas suivants :

- positivité de deux ELISA de principes différents, chez une personne avec ou sans signe clinique pathognomonique d'une infection à VIH.

- positivité d'un ELISA dans des situations particulièrement évocatrices d'une infection à VIH, telles que la maladie de Kaposi disséminée, le molluscum contagiosum disséminé, la leucoplasie chevelue de la langue...

- positivité persistante d'un ELISA chez le nourrisson de mère séropositive, plus de 18 mois après la naissance.

VII-TRAITEMENT ANTIRETROVIRAL.

1-Aspects pharmacologiques (338).

Actuellement, une vingtaine de molécules antirétrovirales sont utilisables dans le traitement étiologique de l'infection à VIH. Elles sont virustatiques par inhibition de la transcriptase inverse ou de la protéase virales.

Les Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse ou INTI ou NRTI (*Nucleosidic Reverse Transcriptase Inhibitor*) bloquent l'élongation de l'ADN,

mais se sont des prodrogues n'agissant qu'après triphosphorylation en 5' assurée par diverses kinases intracellulaires. La zidovudine ou AZT (azidothymidine) doit ainsi être transformée en AZT-TP (AZT-triphosphate), la stavudine ou d4T (2',3'-didéshydro-2',3'-didésoxy-thymidine) en d4T-TP, la lamuvidine ou 3TC en 3TC-TP, la zalcitabine ou ddC en ddC-TP. Pour la didanosine ou ddi et l'abacavir, les dérivés monophosphorylés (ddi-MP et abacavir-MP) sont d'abord transformés en ddA-MP et carbovir-MP qui vont aboutir à la ddA-TP et au carbovir-TP. Quant à l'adéfovir, un analogue nucléotidique, une seule étape de phosphorylation est nécessaire.

Les Inhibiteurs Non Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse ou INNTI ou NNRTI (*Non Nucleosidic Reverse Transcriptase Inhibitor*) agissent directement en se liant à la transcriptase, à proximité du site actif, entraînant un changement conformationnel défavorable à l'activité enzymatique.

Les Inhibiteurs de la Protéase (IP) ou Antiprotéases sont des molécules peptidomimétiques qui agissent directement en se fixant au site de liaison des précurseurs pr55gag et pr160gag-pol à l'enzyme, empêchant ainsi le clivage de ces substrats. En outre, leur effet inhibiteur propre sur l'apoptose lymphocytaire pourrait limiter la diminution des lymphocytes T CD4+ circulants (305).

Les principaux ARV disponibles (tableau V) permettent un traitement antirétroviral « hautement actif » ou HAART (*Highly Active Antiretroviral Treatment*) associant généralement trois molécules. Les trithérapies, dont l'efficacité a été prouvée depuis 1996 (217), peuvent être des associations « convergentes » de 2 INTI + 1 INNTI, ou surtout des associations « divergentes » bloquant les deux enzymes virales, avec 2 INTI (AZT/3TC ou AZT/ddi) + 1 IP. On obtient une diminution spectaculaire de la charge virale plasmatique, qui peut même devenir indétectable dès la 24^{ème} semaine de trithérapie.

Molécule	Abréviation	Spécialités	Laboratoire
INHIBITEURS NUCLEOSIDIQUES DE LA TRANSCRIPTASE INVERSE			
Zidovudine	AZT	RETROVIR, COMBIVIR	Glaxo-Wellcome
Didanosine	DDI	VIDEX	Bristol-Myers Squibb
Zalcitabine	DDC	HIVID	Roche
Stavudine	d4T	ZERIT	Bristol-Myers Squibb
Lamivudine	3TC	EPIVIR, COMBIVIR	Glaxo-Wellcome
Abacavir	ABC	ZIAGEN	Glaxo-Wellcome
Adéfovir	ADV	PREVEON	Gilead Sciences
INHIBITEURS NON NUCLEOSIDIQUES DE LA TRANSCRIPTASE INVERSE			
Névirapine	NVP	VIRAMUNE	Boehringer-Ingelheim
Delavirdine	DLV	RESCRIPTOR	Pharmacia-Upjohn
Efavirenz	EFV	SUSTIVA	Dupont Pharmaceuticals
INHIBITEURS DE LA PROTEASE			
Saquinavir	SQV	INVIRASE, FORTOVASE	Roche
Ritonavir	RTV	NORVIR, KALETRA	Abbott
Indinavir	IDV	CRIVAN	MSD
Nelfinavir	NFV	VIRACEPT	Roche
Amprénavir	APV	AGENERASE	GlaxoSmithKline
Lopinavir	LPV	KALETRA	Abbott
Tipranavir	TPV	-	Pharmacia-Upjohn
Atazanavir	TAZ	-	Bristol-Myers-Squibb

Tableau V : Principaux médicaments antirétroviraux. De nombreuses versions génériques sont de plus en plus proposées, notamment dans le cadre de la baisse des prix accordée aux pays en voie de développement. D'autres molécules sont en étude, dont celles agissant sur d'autres cibles pharmacologiques du cycle répliatif du VIH: les inhibiteurs de la fixation-pénétration (8, 309), les inhibiteurs de l'intégrase (130) et les inhibiteurs de la transcription (anti-*tat*, anti-*rev*).

Parallèlement, il y a une restauration immunitaire (19) par l'augmentation significative du taux de lymphocytes CD4+, grâce à :

-une recirculation de cellule T CD4+ mémoires revenant à une quiescence

normale, avec restauration de leur capacité de réponse aux stimuli antigéniques.

-la régénération en cellules « naïves » permettant une reconstitution immunitaire plus durable.

La construction des trithérapies doit tenir compte de certaines données pharmacologiques :

-l'existence d'une compétition entre l'AZT et la d4T pour la phosphorylation intracellulaire impose de ne pas associer ces deux ARV pivots, très actifs, de bonne pénétration dans le système nerveux central et relativement moins toxiques.

-l'existence d'associations largement étudiées, dont l'efficacité et la tolérance sont acceptables, comme AZT + 3TC (ou ddC ou ddI), d4T + ddI (ou 3TC).

-l'existence de formes galéniques d'ARV associés, pour le confort de prise.

-les résistances croisées pour les protocoles de relais en cas d'échecs thérapeutiques (voir *infra*).

-les risques de toxicités cumulées sur un même organe cible, ainsi que les interactions médicamenteuses liées au catabolisme hépatique (via l'isoenzyme CYP3A4 du cytochrome P450) des INNTI et des antiprotéases.

De nombreux effets secondaires sont provoqués par les ARV. Les INTI, par toxicité mitochondriale, peuvent induire des neuropathies périphériques (ddC, ddI, d4T), une myopathie (AZT), une cardiomyopathie (AZT, ddC, ddI), une stéatose et une acidose lactique (AZT, ddI, d4T), une pancréatite (ddC, ddI, d4T, adéfovir), une tubulopathie proximale (adéfovir), une pancytopenie (AZT), une hépatite médicamenteuse (ddI), des troubles digestifs (AZT, ddI), des éruptions toxico-allergiques (abacavir), aphtes buccaux (ddC). Les INNTI provoquent surtout des signes cutanés (névirapine) ou neurologiques (éfavirenz), tandis que les antiprotéases provoquent des diarrhées, une hépatite, une toxicité rénale (par cristallisation de l'indinavir). Les syndromes lipodystrophiques associent des anomalies cliniques (lipoatrophie des membres et du visage, lipohypertrophie

prolongé INTI+IP, ils constituent une hantise majeure pour la prise en charge, à l'instar de l'émergence des résistances virologiques.

2-Résistances aux antirétroviraux (ARV).

Elles sont générées principalement par les erreurs rétro-transcriptionnelles de la RT au niveau de certains codons du gène *pol*, aussi bien dans la région codant pour la RT que celle codant pour la protéase virale.

2.1-Principales mutations induisant des résistances

Un certain nombre de mutations dans le gène *pol* sont responsables de la résistance *in vitro* et *in vivo* des souches de VIH-1 aux antirétroviraux. Elles concernent aussi bien la RT que la Protéase. Les principales positions de ces mutations sont régulièrement répertoriées dans la base de données de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu>). Le niveau de résistance conféré varie selon la position et l'ARV (tableaux VI, VII et VIII).

Position mutation	Niveau de Résistance observé pour					
	AZI	D4T	TDF	ABC	DDI	3TC
41						
67						
70						
210						
215						
219						
184	*	*	*			
69						
65						
74	*		?			
75T			?	?		
62						
75I						
77						
116						
151						
69SS						
44						
118						
115						

Tableau VI:
Principales mutations et conséquences sur la sensibilité du VIH-1 aux INTI.

■	Résistance haut niveau ou intermédiaire
■	Résistance intermédiaire
■	Résistance bas niveau
■	Contribution à la résistance
■	Sensibilité normale
?	Sensibilité indéterminée
*	Hypersensibilité

2.2-Méthodes d'études des résistances aux ARV.

Deux groupes de tests sont actuellement disponibles pour étudier la résistance du VIH aux ARV (44, 45).

2.2.1-Tests phénotypiques.

Ils évaluent directement la capacité du VIH à se multiplier en présence d'une gamme de concentration d'ARV, ce qui permet de déterminer les Concentrations Inhibitrices 50% et 90% , CI_{50} et CI_{90} , exprimées en micromolaires (μM) ou en nanomolaires (nM). On distingue :

-Les Tests Phénotypiques Classiques type ANRS AC11 et ACTG (*AIDS Clinical Trial Group*) . La première étape consiste à isoler le virus par coculture classique des lymphocytes du patients avec des lymphocytes d'un donneur séronégatif activés par la phytohéماغglutinine (PHA). La seconde étape est la mise en culture de plusieurs dilutions du surnageant de la primoculture virale en présence d'une gamme de concentration de l'ARV dont l'effet est apprécié en mesurant la diminution de l'activité transcriptasique inverse (test ANRS) ou de la production de l'antigène p24 (test ACTG) dans les surnageants.

L'avantage de ces tests est la mesure directe de la sensibilité aux ARV, avec des résultats standardisés, mais ils sont très coûteux, techniquement lourds et long (3 à 4 semaines) à effectuer, et surtout ne s'adressent qu'aux virus présents dans les PBMC car la culture est négative à partir du plasma des patients traités. Or, dans ces lymphocytes la détection de l'émergence des mutants résistants ne peut se faire que plusieurs semaines après cette possibilité dans le plasma. En effet, c'est au niveau de l'ARN viral plasmatique, de demi-vie très courte (moins de 6 heures) qu'est d'abord détectée la sélection des premiers mutants. Les lymphocytes périphériques peuvent aussi ne contenir qu'un provirus témoin d'un VIH archivé depuis longtemps (Z4).

-Le Recombinant Virus Assay ou RVA : initialement décrit par *Kellam et*

Larder en 1994 (166), il en existe différentes versions comprenant les étapes suivantes : extraction d'ARN viral plasmatique, rétrotranscription en ADNc des gènes de la protéase et/ou de la RT, amplification de ces gènes par PCR, co-transfection avec un clone d'ADN proviral délété des gènes de la protéase et/ou de la RT conduisant à l'obtention d'un clone complet et infectieux, culture du virus recombinant homologue en présence d'ARV et détermination des CI_{50} et CI_{90} par des procédés variables selon les fabricants (Virco, Virologic).

Les avantages des tests recombinants sont une réduction du délai des résultats à une dizaine de jours et l'utilisation de l'ARN viral plasmatique (qui doit cependant atteindre un taux de 500 voire 1000 copies/ml pour réussir une RT-PCR). Mais ils sont sophistiqués et très coûteux.

2.2.2-Tests génotypiques.

Ils consistent en la mise en évidence, dans les régions codant pour la RT et la Protéase, des mutations répertoriées comme étant associées à la résistance à un ou plusieurs ARV. Ces données sont régulièrement mises à jour dans le site <http://hivdb.stanford.edu/hiv> . L'étape commune est l'extraction de l'ARN viral plasmatique suivie de RT-PCR. Puis, on peut effectuer :

- le séquençage automatique partiel ou total des fragments amplifiés des régions RT et Protéase.

- la PCR sélective, mettant en jeu des amorces correspondant aux codons sauvage et muté.

- le PMA (*Point Mutation Assay*) qui est une PCR sélective avec des amorces radioactives et qui permet une quantification de la proportion de virus mutés au codon étudié.

- le LIPA (*Line Probe Immuno Assay*) qui utilise des amorces biotinylées et des sondes correspondant aux principaux codons de mutation de résistance, déposées en ligne sur une membrane de nylon découpée en bandelette. Ce test peut être mis

en défaut, surtout pour des souches non-B mutées au codon 74 (168).

-la technologie des « Puces » : l'ADNc obtenu contenant des séquences promoteurs de l'ARN polymérase T3 et T7, est transcrit en ARN fluorescent en présence d'UTP marqué à la fluorescéine. Cet ARN est coupé par chauffage à 95°C pendant 30 mn, en fragments de 20 à 100 nucléotides qui sont mis à hybrider avec des sondes fixées dans des puces. L'intensité de la fluorescence au niveau de chaque puce est évaluée au microscope à laser.

Les tests génotypiques sont moins difficiles à effectuer, et les résultats peuvent être rendus en quelques jours. L'interprétation nécessite une bonne expertise, une base de données régulière mise à jour, et elle doit aussi tenir compte de l'interaction complexe de certaines mutations entre-elles et du polymorphisme de la région protéase du gène *pol*. *Beerenwinkel et al (28)* ont proposé une approche bioinformatique de prédiction du phénotype à partir du génotype disponible au site <http://cartan.gmd.de/geno2pheno.html>.

Il faut préciser que tous les tests phénotypiques et la plupart des tests génotypiques sont relativement incapables de déceler les premiers mutants résistants sélectionnés par un traitement antirétroviral, car ils ne peuvent détecter des variants minoritaires constituant moins de 20% de la population virale circulante.

2.3-Résistances aux ARV et stratégies thérapeutiques.

Les données sur la résistance aux ARV au cours de divers essais thérapeutiques ont en grande partie contribué à faire les principales recommandations thérapeutiques suivantes :

-débuter le traitement ARV chez les patients au stade clinique C et/ou si le taux de lymphocytes CD4+ est inférieur à 200 cellules/mm³, ou 350 chez les paucisymptomatiques.

-l'objectif du traitement doit être de bloquer la replication virale, car toute

réplication résiduelle expose à l'émergence de mutations de résistance. Il faut instituer en première intention une trithérapie avec deux Inhibiteurs Nucléosidiques de la RT et une Antiprotéase, en évitant les molécules pour lesquelles les résistances sont croisées : ddI et ddC, Indinavir et Ritonavir.

-en cas d'échec virologique, le changement du traitement doit se faire le plus tôt possible et les molécules de remplacement ne doivent pas avoir de résistances croisées avec les précédentes. Différents traitements de relais sont proposés (tableau IX).

TRAITEMENT INITIAL	TRAITEMENT DE 2 ^{ème} INTENTION
AZT-ddI ou ddC (+ ou - NVP)	AZT-3TC-IP ou d4T-3TC-IP
AZT-3TC (+ ou - NVP)	d4T-ddI-IP ou (d4T)-RTV-SQV
d4T-ddI ou ddC (+ ou - NVP)	AZT-3TC-IP ou (AZT)-RTV-SQV
d4T-3TC (+ ou - NVP)	AZT-ddI-IP ou (AZT)-RTV-SQV
Ritonavir	RTV-SQV
Indinavir	RTV-SQV
Saquinavir	RTV ou IDV ou IDV-NVP
Nelfinavir	IDV ou RTV-SQV

Tableau IX : Propositions de relais de traitement en cas d'échec virologique. D'après *Brun-Vézinet et al (45)*.

Au total, il faut donc préciser qu'aucun traitement étiologique actuel, fût-il "précoce et fort" (134) n'est efficace à 100%, car l'inhibition de la réplication virale est toujours levée à l'arrêt de celui-ci. Il doit être poursuivi à vie, ce qui pose sans doute le problème de son observance et de sa tolérance. Des arrêts contrôlés sont proposés pour lever les effets toxiques. L'hypothèse récente d'administration concomitante (ou en relais) de vaccins thérapeutiques constitue un réel espoir pour freiner l'évolution de l'infection à VIH tout en allégeant la trithérapie.

Le suivi biologique indispensable au cours du traitement ARV à deux buts :

-déceler les effets secondaires des ARV chez le patient, de façon à les corriger

ou à modifier le protocole.

-contrôler l'efficacité des produits par l'évaluation de la charge virale plasmatique qui doit rester indétectable, et du taux de lymphocytes CD4+ qui doit augmenter significativement. La restauration immune sous traitement serait plus importante quand l'infection est récente (6).

3. Accès aux ARV en Afrique Subsaharienne.

Pendant que plus de 75% des personnes infectées par le VIH se trouvent en Afrique Subsaharienne, l'accès au traitement antirétroviral est encore très largement insuffisant. En décembre 2002, à peine 1% d'adultes infectés en ont bénéficié. Ce taux est au moins 4 fois plus faible que dans les autres régions en voie de développement : 4% en Asie, 9% en Europe de l'Est et en Asie Centrale, 29% en Afrique du Nord et au Moyen-Orient, 53% en Amérique Latine et au Caraïbes (143).

Le principal problème est le manque de moyens financiers. Il faut malgré tout que les Etats assument leur volonté politique d'organiser de façon effective l'accès à ce traitement, par :

-la recherche et la mise en place des ressources financières pour constituer le plateau technique nécessaire et pour subventionner l'achat de ces médicaments par les malades.

-l'organisation d'un circuit fiable d'approvisionnement et de contrôle des ARV.

Des initiatives pilotes existent cependant dans certains pays comme l'Ouganda, la Côte d'Ivoire, et surtout le Sénégal qui est le premier pays d'Afrique à proposer une prise en charge thérapeutique antirétrovirale à travers un programme public soutenu au plus haut niveau de l'Etat. En effet, l'Initiative Sénégalaise d'Accès aux Antirétroviraux (ISAARV) a été conçue dès 1998 pour traiter toute personne vivant avec le VIH résidant au Sénégal et dont le statut bioclinique répond aux critères collégalement établis par un comité médical technique. Une enquête

socio-économique permet de fixer le montant de la participation du patient éligible à son traitement, la différence étant couverte par une subvention annuelle étatique. L'augmentation régulière de cette subvention témoigne de la volonté politique irréversible du Sénégal, ainsi que de la crédibilité des acteurs et du bilan de l'ISAARV présenté en octobre 2002 (2). Le prochain défi est d'élargir cette initiative à l'échelle nationale. Le Brésil possède le programme ARV le plus avancé du tiers monde, avec 115 000 participants dès juin 2002.

Au niveau mondial, la conférence sur le SIDA de Barcelone en juillet 2002 a fait le point sur l'immensité et l'urgence des besoins des pays du Sud en matière de traitement VIH/SIDA couverts qu'à 5%. L'accès au traitement est d'ailleurs le thème de la 13^{ème} CISMMA prévue en septembre 2003 à Nairobi au Kenya. Afin de faire face aux demandes exprimées par les pays en développement, il fut créé en décembre 2002 une coalition internationale pour l'accès au traitement : l'ITAC (*International HIV Treatment Access Coalition*)(143). Elle regroupent plusieurs partenaires: Personnes vivants avec le VIH et leurs avocats (*Global Network of People Living with HIV/AIDS*), Organisations Non Gouvernementales (*African Council of AIDS Service Organizations, International HIV/AIDS Alliance, International AIDS Society, Global Business Coalition on HIV/AIDS*), Gouvernements, Fondations, Secteurs Privés, Institutions Académiques et de Recherche, Organisations Internationales (ONUSIDA, OMS, Banque Mondiale).

Dans tous les cas, l'introduction à grande échelle des ARV en Afrique, outre l'aspect financier, nécessite une organisation pluridisciplinaire rigoureuse et un bon suivi de leur efficacité à travers la surveillance des échecs cliniques et virologiques des protocoles thérapeutiques, surtout dus à l'émergence des variants résistants.

PROBLEMATIQUE DE LA VARIABILITE DU VIH

PROBLEMATIQUE DE LA VARIABILITE DU VIH.

I-DIFFERENTS TYPES DE VARIABILITE DU VIH.

1-Variabilité génétique.

1.1-Déterminisme.

La mauvaise fidélité de la transcriptase inverse, due à l'**absence d'activité 3'-5' exonucléasique** permettant les corrections d'erreurs (265, 276), est responsable d'un taux de mutation ponctuelle de 10^{-4} à 10^{-5} /base/cycle répliatif, soit environ 10^{-5} à 10^{-6} erreurs par jour chez une personne infectée (66), ou encore une mutation par génome par cycle.

A cela s'ajoutent un **important pouvoir recombinoène** de brins homologues d'ARN génomiques (141, 265) et divers autres processus : transfert anormal (319), translocation et glissement (26), addition de purines en 3' de l'ADN proviral, hypermutations G/A (37), insertion et délétion.

Les effets de tous ces mécanismes sont amplifiés par un *turn over* particulièrement rapide *in vivo*, d'environ un milliard de néo-virions VIH par jour (136, 343).

La variabilité ne survient pas avec la même ampleur dans toutes les régions du génome. Le gène *env* est le plus concerné; viennent ensuite les gènes *nef*, *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *gag* et *pol*, dans l'ordre décroissant de fréquence.

1.2-Diversité génétique du VIH-1.

Sur la base d'analyses phylogénétiques de nombreuses souches d'origines diverses, trois groupes de VIH-1 ont été définis (277): groupe M (*Major*), groupe O (*Outlier*) et groupe N (*Non-M Non-O*) qui résulteraient de trois transmissions zoonotiques indépendantes à partir du chimpanzé *Pan troglodytes troglodytes* (figure 8).

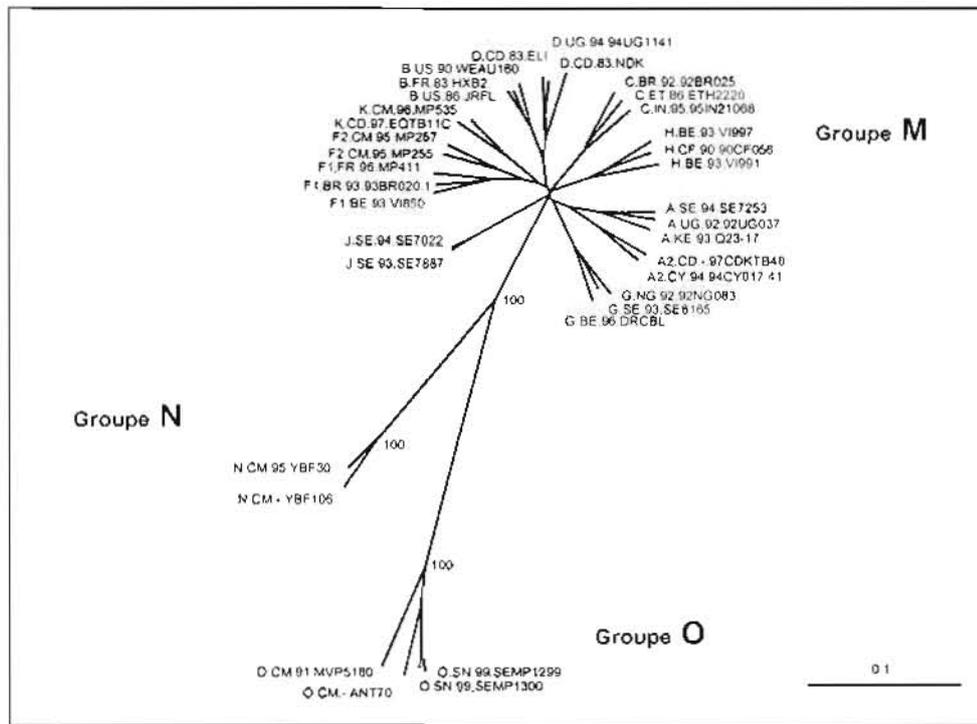


Figure 8 : Relations phylogénétiques entre les trois groupes de VIH-1, ainsi que la subdivision en sous-types et sous-sous-types dans le groupe M.

1.2.1-VIH-1 du groupe M.

1.2.1.1-Sous-types et sous-sous-types.

L'analyse phylogénétique des séquences génomiques complètes de nombreuses souches virales de ce groupe a permis de définir 9 sous-types « purs » (ou clades) de VIH-1 du groupe M, désignés par les lettres A, B, C, D, F, G, H, J, K. Ils sont approximativement équidistants entre-eux. Les sous-types A et F sont respectivement subdivisés en sous-sous-types A1, A2 (107) et F1, F2 (326, 327). De même, les sous-types B et D s'apparentent à deux sous-sous-types d'un sous-type parental « B-D » non encore autrement nommé pour des raisons historiques (figure 9).

Le degré de divergence est de 20 à 30% entre sous-types, 6 à 19% entre souches d'un même sous-type, 2 à 5% entre isolats séquentiels chez un même patient et 2% au sein d'un même isolat. La variabilité intra-patient est surtout la conséquence de l'accumulation des mutations qui augmentent avec la charge virale

et la progression de la maladie (203). Une même souche peut évoluer différemment d'un patient à un autre (358).

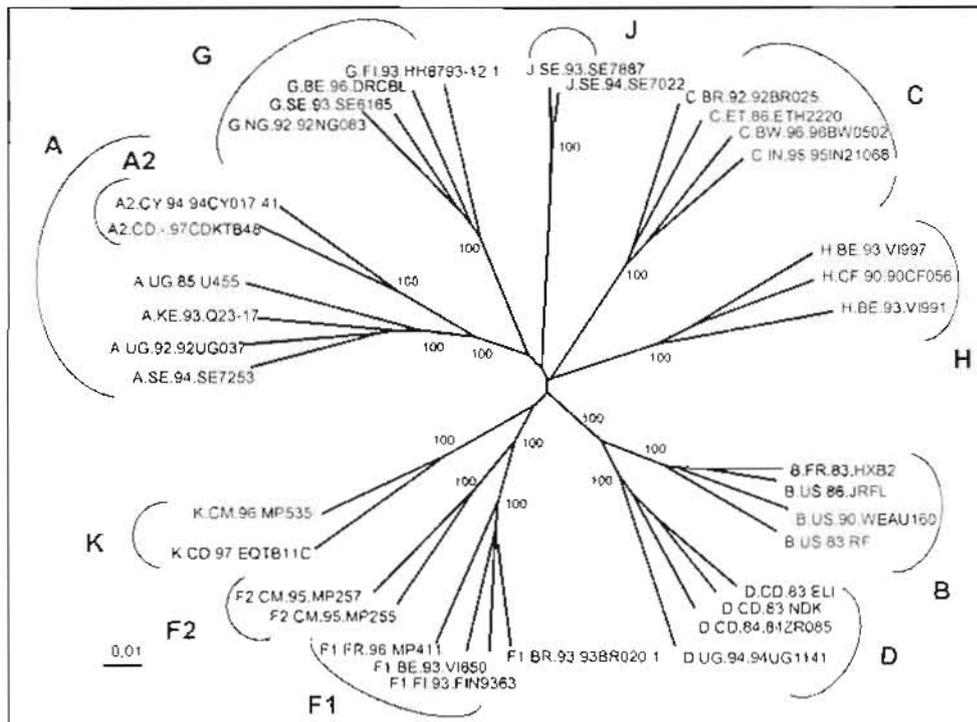


Figure 9 : Relations Phylogénétiques entre sous-types et sous-sous-types du VIH-1 groupe M.

1.2.1.2-Formes Recombinantes Circulantes ou CRFs.

Un CRF (*Circulating Recombinant Form*) est un recombinant dont toutes les souches provenant de divers individus sans liens épidémiologiques présentent la même cartographie génomique. Ce variant doit avoir un potentiel épidémique au sein d'une région géographique et/ou d'une communauté.

Jusqu'en mars 2003, quinze CRFs sont décrits et répertoriés dans la base de données de Los Alamos (<http://hiv-web.lanl.gov/CRFs/CRFs.html>):

-le CRF01_AE (prototype CM240) est un recombinant A/E/U initialement décrit en Thaïland par Carr et al (56) en 1996. Mais l'ex-sous-type E env n'est pas retrouvé comme sous-type « pur » ; de ce fait, les séquences « E » doivent être considérées comme non classées et le CRF devrait s'appeler CRF01_AU (U=Unclassified), mais l'ancienne appellation est encore maintenue pour éviter des

confusions. Ce recombinant est largement répandu en Asie, notamment en Thaïland, mais il est originaire d'Afrique Centrale (106, 225).

-le **CRF02_AG (prototype IbNG)**, d'abord décrit au Nigéria par *Howard et Racheed (139)*, est un recombinant A/G/U très fréquent non seulement dans ce pays (247), mais aussi dans toute l'Afrique de l'Ouest et du Centre (55, 219, 323). Il a été retrouvé hors d'Afrique comme à Taïwan (187).

-le **CRF03_AB (prototype Kal153)** est un recombinant A/B décrit en Russie chez les drogués par voie intra-veineuse de Kaliningrad en 1998 par *Liitsola et al (191)* et Saint Petersburg en 1999 par *Lukashov et al (198)*.

-le **CRF04_cpx (prototype 94CY032)**, précédemment considéré comme un recombinant A/G/I par *Gao et al (105)* et *Nasioulas et al (226)*, renferme en fait des séquences A/G/H/K/U (*Salminen, non publiées*). Ce recombinant circule en Grèce et à Chypre où il a avait été identifié sous-type I (désignation aujourd'hui abandonnée) dans l'enveloppe par *Kostrikis et al (K21)* en 1995.

-le **CRF05_DF (prototype VI310)** est un recombinant D/F/U dont les premières souches décrites, VI310 et VI961, proviennent de deux belges infectés en République Démocratique du Congo où d'autres souches similaires ont été caractérisées par *Laukkanen et al (183)* en 2000.

-le **CRF06_cpx (prototype BFP-90)** est un recombinant confirmé A/G/J/K/U en 2002 par *Montavon et al (220)*. Ceci après une nouvelle analyse des souches BFP-90 du Burkina Faso décrite comme A/G/J/U en 1998 par *Oelrichs et al (233)*. 95ML-84 du Mali décrite comme A/G/I/J/U (218), 97SE-1078 du Sénégal et d'une autre souche malienne 95ML-127. Ce variant est très répandu en Afrique de l'Ouest, et est même retrouvé majoritaire au Burkina Faso par *Ouédraogo-Traoré et al (236)*.

-le **CRF07_BC (souche prototype 97CN54)** est un recombinant B/C/U décrit par *Su et al (314)* en 2000, parmi les drogués par voie intra-veineuse en Chine. D'autres souches chinoises ont été rapportées par *Rodenburg et al (279)* en 2001.

-le **CRF08_BC** (souche prototype **97CNGX-6F**) est un autre recombinant B/C/U de points de recombinaison différents, circulant en China, rapporté par *McCutchan (212)*, *Piyasirisilp et al (258)* en 2000, puis par *Rodenburg et al (279)* en 2001.

-le **CRF09_cpx** (souche prototype **P2911**) a été mentionné par *McCutchan (212)* mais les séquences n'ont pas été publiées.

-le **CRF10_CD** (souche prototype **TZBF061**) est un recombinant C/D/U dont les trois premières souches ont été décrites en Tanzanie par *Koulinska et al (179)* en 2001.

-le **CRF11_cpx** (souche prototype **GR17**) a un génome mosaïque A/G/CRF01_AE/ J/U. La première séquence a été décrite par *Paraskevis et al (238)* en 2000, chez un grec infecté en République Démocratique du Congo. En 2002, trois autres l'ont été par *Montavon et al (221)* et deux nouvelles par *Wilbe et al (348)*, en Afrique Centrale.

-le **CRF12_BF** (souche prototype **BARMA159**) est un recombinant B/F, sans séquence non classée, décrit en Amérique Latine (Argentine, Uruguay) par *Carr et al (53)* en 2001, puis par *Thomson et al (321)* en 2002.

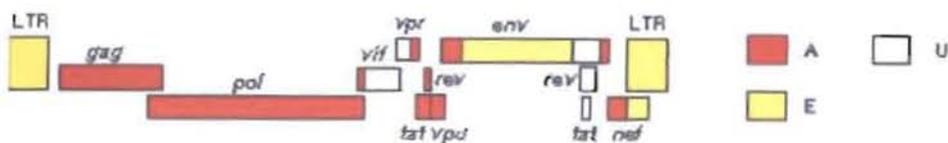
-le **CRF13_cpx** (souche prototype **96CM-1849**) est un recombinant A/CRF01_AE/ G/J/U dont deux souches ont été décrites au Cameroun par *Wilbe et al (348)* en 2002.

-le **CRF14_BG** (souche prototype **X397**) est un variant B/G dont les six premières souches ont été décrites en Espagne par *Delgado et al (77)* en 2002.

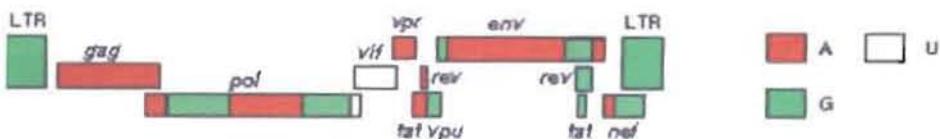
-le **CRF15_01B** a été identifié en Thaïland par le groupe de *McCutchan*, mais la séquence n'est pas encore publiée.

La structure génomique de la souche de référence de chaque type de CRF est disponible, sauf pour le **CRF09_cpx** et le **CRF15_01B** dont les séquences n'ont pas été publiées (figure 10).

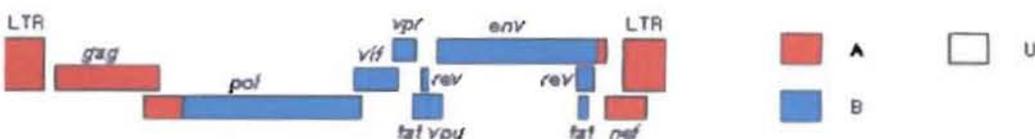
CRF01_AE : souche de référence CM240.



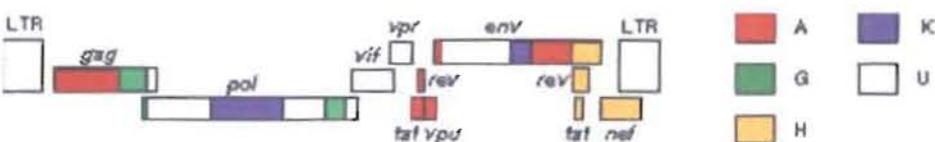
CRF02_AG : souche de référence IbNG.



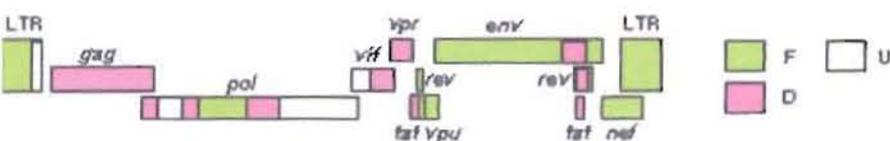
CRF03_AB : souche de référence Kal153.



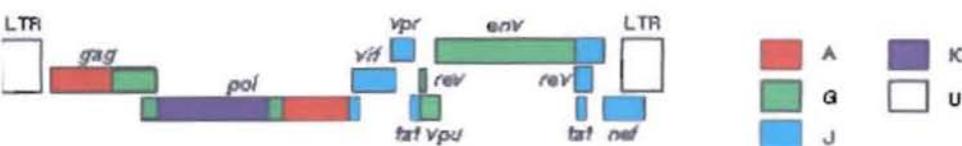
CRF04_cpx : souche de référence 94CY032.



CRF05_DF : souche de référence VI1310.

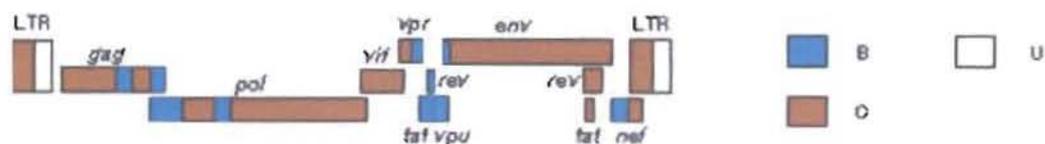


CRF06_cpx : souche de référence BFP90.

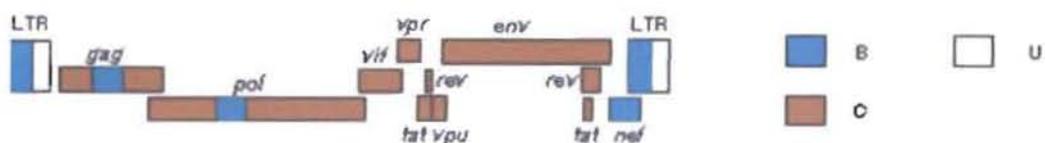


CRF07_BC : souche de référence CN54.

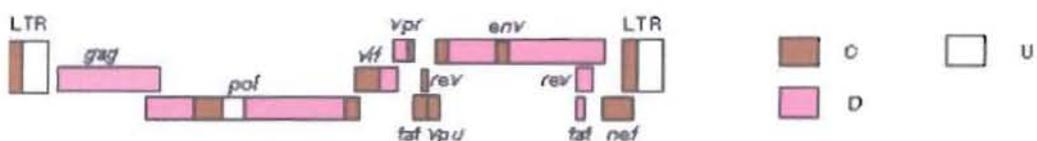
Figure 10 : Cartographie génomique de treize des quinze premiers CRFs décrits. (<http://hiv-web.lanl.gov/CRFs/CRFs.html>).



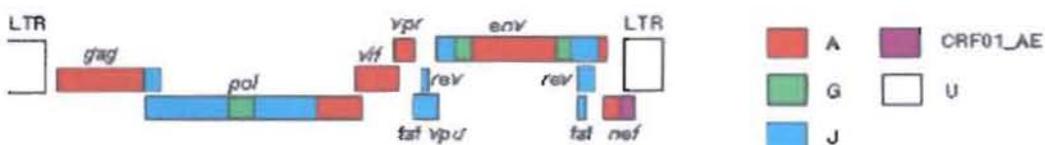
CRF08_BC : souche de référence GX-6F.



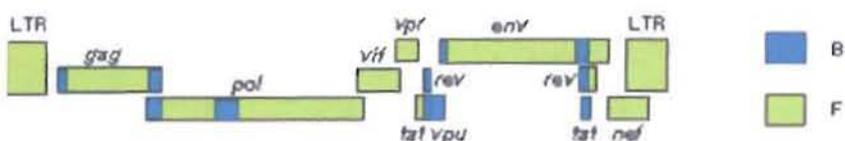
CRF10_CD : souche de référence TZBF061.



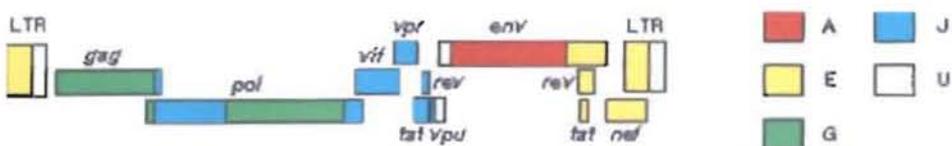
CRF11_cpx : souche de référence GR17.



CRF12_BF : souche de référence ARMA159.



CRF13_cpx : souche de référence 96CM-1849.



CRF14_BG : souche de référence X397.

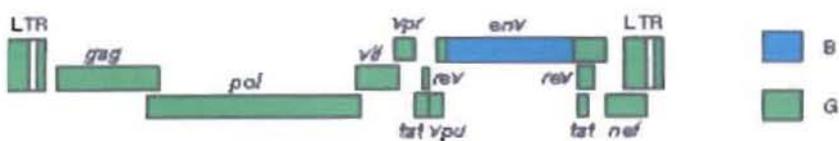


Figure 10 : (suite et fin).

1.2.1.3-Autres Recombinants VIH-1.

De nombreuses souches recombinantes sans potentiel épidémique comparable à celui des CRFs, ont été décrites surtout en Afrique. Par exemple :

-*Robertson et al (278)* ont identifié 9 souches mosaïques dans les régions env et/ou gag, : MAL (A/D/X) en RDC, initialement séquencée en 1986 (4), KE124 (A/D) au Kenya, UG266 (A/D) en Ouganda, ZM184 (C/A) en Zambie, G141 (D/A), LBV 10-5 (A/G) et V1354 (A/G) au Gabon, CI32 (A/D) en Côte d'Ivoire, et BZ200 (B/F) au Brésil.

-*Cornelissen et al (71)* ont décrit des souches B/C et B/F au Brésil, A/C au Rwanda, A/D au Rwanda et en Ouganda. Divers autres recombinants A/D dans pol ont été rapportés récemment par *Eshlman et al (95)* dans ce dernier pays où co-circulent essentiellement les sous-types A et D (155, 156, 157).

-*Babkov et al (32)* ont montré que le recombinant G/X/C serait responsable d'environ 8% des cas d'infection à VIH-1 en Gambie.

-*Dowling et al (86)* ont trouvé que 16 souches sur 41 (soit 39%) sont des recombinants A/C, A/D et A2/D.

Ces variants isolés peuvent se recombiner avec d'autres variants. Par exemple, une recombinaison MAL/sous-type H a été décrite par *Jonassen et al (151)* en Norvège. Même des recombinants inter-groupes M/O ont été identifiés au Cameroun, par *Peeters et al (251)*, et par *Takehisa et al (316)*.

En fait, aussi longtemps que les co-infections et les surinfections pourront survenir, les recombinaisons vont se poursuivre, qu'elles soient inter-sous-types, inter-recombinants ou inter-groupes.

1.2.2-VIH-1 du groupe O.

Ce groupe a été proposé en 1994 par *Charneau et al (59)* pour distinguer les VIH-1 habituels majoritaires formant le groupe M d'un certain nombre de variants

hautement divergents (*Outlier*) dans le gène *env*. Les premières souches caractérisées sont aussi distantes entre-elles que deux souches de sous-types différents dans le groupe M, mais l'analyse des séquences ne donne pas pour l'instant des résultats définissant des sous-types. Récemment, *Yamaguchi et al* (352) ont proposé une subdivision des virus du groupe O en 5 clusters phylogénétiques sur la base de l'analyse des séquences *gag*, *pol* et *env* de 39 souches appartenant à ce groupe, mais leurs constats restent à être confirmés par une analyse phylogénétique de génomes complets d'un nombre plus important de souches.

La première souche de VIH-1 groupe O, ANT70, fut isolée en Belgique d'un patient camerounais en 1990 par *De Leys et al* (76), puis clonée et entièrement séquencée en 1994 par *Van Den Haesevelde et al* (331). Son gène *env* a moins de 50% d'homologie avec celui des souches prototypes VIH-1 HXB2 et VIH-1 MAL, contre 53% pour la deuxième souche O, MVP-5180 isolée en 1994 d'un autre camerounais en Allemagne par *Gürtler et al* (123).

De nombreuses autres souches ont été décrites par la suite :

- en majorité au Cameroun (210, 357) où les virus de ce groupe sont les plus fréquents et responsables d'environ 8% des cas d'infection à VIH-1.

- dans d'autres pays africains, surtout autour du Cameroun (131, 142, 147, 224, 248, 306) qui semble être l'épicentre de l'infection par les virus de ce groupe.

- en Europe (126, 206, 307) et aux USA (120, 269). La France compte le plus grand nombre de cas décrits en Europe: une trentaine de personnes ayant presque toutes un facteur d'exposition les rattachant à l'Afrique Centrale (194). Par ailleurs, *Jonassen et al* (152) ont rétrospectivement démontré que les trois premiers cas documentés de SIDA en Europe étaient dus à des souches du groupe O. Il s'agit d'un marin norvégien et sa femme qui moururent en 1966, ainsi que de leur fille décédée en 1976.

La variabilité intra-patient des virus du groupe O est également importante.

Ainsi, des prélèvements séquentiels effectués sur une période de 10 ans chez la patiente infectée par la souche ANT70 ont des variations intra- et inter-échantillons de plus en plus grandes (149).

1.2.3-VIH-1 groupe N.

Le groupe N a été proposé en 1998 par *Simon et al* (304) suite à l'analyse phylogénétique d'une souche camerounaise de VIH-1, YBF30, suffisamment divergente des virus des groupes M et O. Les quelques souches actuellement identifiées dans ce groupe N (20, 304) et celles des SIVcpz du Cameroun forment un même subcluster au niveau des gènes *env* et *nef*. Ces données phylogénétiques laissent suggérer une possible recombinaison entre un SIVcpz-like et un HIV-1-like à l'origine de ces nouveaux virus (70, 104).

1.2.4-Distribution géographique des variants VIH-1.

La subdivision en sous-types, sous-sous-types, CRFs et recombinants uniques de VIH-1 (277) n'a pas à ce jour de corrélation physiopathologique, mais elle a par contre une correspondance géographique, eu égard aux données actuelles. C'est un puissant marqueur épidémiologique moléculaire pour suivre l'évolution de la pandémie du SIDA.

La distribution géographique globale des sous-types et autres variants VIH-1 est très hétérogène (185, 212, 252).

En Afrique Subsaharienne, tous les groupes, sous-types, sous-sous-types, au moins 7 CRFs et de nombreux recombinants uniques ont été décrits. Il y a cependant de grandes différences selon les régions, les pays, voire au sein d'un même pays. La plus grande diversité est observée en Afrique Centrale où tous les variants des groupes M, N et O sont présents, particulièrement en République Démocratique du Congo (340), avec cependant une prédominance des sous-types A, C et D. On note aussi une prédominance du CRF02_AG en Afrique de l'Ouest, du sous-type C en Afrique du Sud et de l'Est, du CRF01_AE en Asie (figure 10).

En Europe, en Amérique du Nord et en Australie, la quasi-exclusivité initialement constatée du sous-type B est confrontée à l'introduction de sous-types non-B rapportée dans plusieurs études : en France (58, 182, 208, 302), en Roumanie (14), en Suède (3, 5454), etc.



Figure 11: Distribution géographique globale des variants VIH-1.

1.3-Diversité génétique du VIH-2.

L'analyse de la variabilité des séquences de souches VIH-2 a permis de définir 7 sous-types: A à G (108, 351), qui, par rapport aux distances génétiques, répondent à la définition de groupes attribués décrits pour le VIH-1. La grande majorité des souches appartiennent aux sous-types A et B, prédominant respectivement dans la partie ouest (Guinée-Bissau, Sénégal) et en Côte d'Ivoire (73, 145, 256, 294). Pendant que la seule souche de sous-type G (Abt96) provenait d'un donneur de sang d'Abidjan (351), la plupart des souches des sous-types C à F ont été décrites en zones rurales en Sierra Léone et au Libéria. Elles sont toutes génétiquement plus proches des SIVsm circulant dans les mêmes zones que d'autres VIH-2, ce qui accrédite l'idée de passages accidentels indépendants du sooty mangabey à l'homme (124).

Sur le plan biologique, le VIH-2 est plus difficile à cultiver que le VIH-1. Les VIH-2 sous-types A, C et E semblent particulièrement difficile à isoler en co-culture lymphocytaire. Des différences de tropisme cellulaire ou de régulation de l'expression virale, la présence d'une proportion anormalement élevée de virions défectifs dans la population virale pourraient évoquées. Cependant la corrélation avec d'éventuelles différences de pathogénicité n'est pas démontrée.

2-Variabilité biologique du VIH-1.

Elle concerne trois aspects de la biologie du VIH : le tropisme cellulaire, la cinétique de réplication et la cytopathogénicité.

2.1-Variants R5, R5X4 et X4.

Le tropisme cellulaire du VIH varie au cours de l'infection. La population virale est d'abord majoritairement composée de virions utilisant le corécepteur CCR5 appelés **variants R5**. L'affinité pour ce corécepteur ne semble pas dépendre du sous-type viral et du polymorphisme du CCR5 (359). Ils ont un tropisme préférentiel pour les macrophages, d'où l'appellation de variants M-tropiques ou M-T. Ils sont progressivement remplacés par des **variants R5X4** qui utilisent indifféremment le CCR5 et le CXCR4. Quant aux **variants X4**, encore appelés T-tropiques ou L-T pour le tropisme préférentiel pour les lymphocytes T4, ils vont émerger vers la fin de la phase de latence clinique, et relayer les R5X4 au fur à mesure que s'affirme la phase symptomatique de l'infection.

Ce changement de tropisme résulte des mutations affectant la gp120, entraînant un changement dans l'utilisation des co-récepteurs membranaires (83).

2.2-Variants *Rapid/High* et *Slow/Slow*.

Les variants *Rapid/High* correspondent à des virus isolés des PBMC, qui se multiplient rapidement in vitro, avec une activité transcriptase inverse élevée dans le milieu de culture.

Les variants *Slow/Slow* sont, par contre, des virus à multiplication lente, avec

une activité transcriptase inverse faible. Selon leur capacité à se répliquer in vitro dans les PBMC et les lignées cellulaires, ces variants se subdivisent en trois sous-groupes :

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

2.3-Variants NSI/SI (Non Syncytium Inducing/ Syncytium Inducing).

L'effet cytopathogène du VIH se manifeste par l'apparition de syncytia, mais seulement pour les variants SI qui apparaissent généralement longtemps après le début de l'infection, pour co-exister ou remplacer les variants NSI.

L'apparition de variants SI est le plus souvent corrélée à une diminution importante du taux de lymphocytes T CD4+. Mais la recherche de tels variants peut s'avérer négative même chez des malades au stade SIDA (163). Par ailleurs :

- les variants R5 se répliquent lentement, sont peu ou pas cytopathogènes, et correspondent aux variants *Slow/Slow* et NSI.
- les variants X4 se répliquent rapidement, sont cytopathogènes, et correspondent aux variants *Rapid/High* et SI.

3-Variabilité antigénique du VIH-1.

La variabilité génétique du VIH-1 se traduit par une variabilité phénotypique conduisant à une dérive antigénique au cours de l'évolution de l'infection. Cette dérive concerne surtout les domaines variables de la glycoprotéine de surface gp120, notamment la boucle V3, cible principale des anticorps neutralisants. L'affinité de ces derniers peut s'affaiblir pour la boucle V3 de certains variants antigéniques qui pourront émerger sous l'effet de la pression immunitaire (349).

La dérive antigénique influence également l'efficacité de la reconnaissance des

antigènes viraux par les lymphocytes T cytotoxiques (231), par des mécanismes allant de la simple non-reconnaissance à la compétition, voire à la genèse d'antagonistes de l'activation des CTL. Cela a été décrit pour des épitopes des protéines gag, pol et nef (172, 215, 231).

Progressivement, les variants antigéniques et la baisse subséquente de l'efficacité de la réponse immune vont conduire à une diversification de la population virale contribuant à aggraver l'incapacité du système immunitaire à éliminer l'infection. Dans tous les cas, un variant majoritaire, souvent plus pathogène, va proliférer et persister.

Remarque: les sous-types A et C, phylogénétiquement distants, sont très proches sur le plan phénétique. L'inverse est observé entre les sous-types B et D qui sont actuellement considérés comme deux sous-sous-types d'un sous-type « B-D ».

II-CONSEQUENCES DE LA VARIABILITE DU VIH.

1-Variabilité et transmission du VIH.

Une plus grande efficacité de transmission du VIH-1 par rapport au VIH-2 a déjà été démontrée, aussi bien par la voie hétérosexuelle (161, 162) que par la voie mère-enfant (1, 12).

De même, certains arguments plaident en faveur d'une différence dans la capacité de transmission des divers sous-types de VIH-1. *Kunauont et al (181)* ont obtenu des résultats suggérant une plus grande efficacité de transmission par voie hétérosexuelle du CRF01_AE par rapport au sous-type B. *Soto-Ramirez et al (308)* ont montré une répllication plus importante des isolats C par rapport aux isolats B dans les cellules de Langherans en culture. Or ces dernières sont les cellules cibles de première importance dans la transmission hétérosexuelle du VIH. Mais *Dittmar et al (84)* n'ont pas retrouvé de différence de tropisme pour ces cellules entre les isolats des sous-types A à F provenant d'une contamination hétérosexuelle et ceux provenant d'homosexuels. *Mastro et De Vincenzi (207)* ont rapporté aussi un

risque de transmission sexuelle similaire pour les variants B et CRF01_AE.

Pour la transmission mère-enfant, *Renjifo et al (272)* avaient montré une moindre transmissibilité du sous-type D par rapport aux sous-types A, C et à des recombinants inter-sous-types.

2-Variabilité et pathogénèse de l'infection à VIH.

L'important potentiel de variabilité du VIH chez le sujet infecté permet à ce virus de persister malgré l'environnement hostile développé par le système immunitaire. Il s'établit une infection chronique active, entretenue par des variants antigéniques échappant à la réponse immune (242) et se diversifiant au cours du temps (214). Donc la plasticité génétique est un facteur déterminant dans la physiopathologie et l'évolution de l'infection à VIH. *Shpaer et Mullins (301)* avaient suggéré l'existence d'une étroite corrélation entre le degré de variabilité du virus et sa pathogénicité. A ce titre, le sous-type D, qui engendrerait plus facilement des quasi-espèce, est souvent considéré comme le plus pathogène (174), en l'absence cependant de toute preuve physiopathologique.

Les différences éventuelles de pathogénicité entre sous-types pourraient être élucidées par la constitution et le suivi de cohortes de sujets infectés par ces différents variants. *Kaleebu et al* avait suggéré (156), puis confirmé sur une cohorte de 1045 patients ougandais (155), que le sous-type D entraîne une progression plus rapide de la maladie que le sous-type A. *Kanki et al (160)* ont rapporté un taux de progression vers le SIDA moins élevé pour le sous-type A que pour les sous-types C, D, G dans la cohorte de prostituées de Dakar. Mais d'autres travaux n'ont pas retrouvé de différences. Ainsi, *Laurent et al (184)* ont rapporté l'absence de différence significative dans l'évolution clinique entre l'infection par le CRF02_AG et l'infection par les autres variants VIH-1 en Afrique de l'Ouest et du Centre. Il en est de même des études de *Alaeus et al (4)* sur les sous-types A à D, et de *Weisman et al (344)* sur les variants B et C chez des israéliens et des migrants éthiopiens.

Au niveau inter-typique, plusieurs travaux ont montré une plus grande pathogénicité du VIH-1 par rapport au VIH-2 dont l'infection, quoique conduisant aussi au même SIDA, évolue moins vite (10, 204). De même pour le VIH-2, il a été rapporté l'existence d'une corrélation significative entre la présence de certains motifs de la boucle V3 de la glycoprotéine de surface et le stade clinique (34, 180). D'autre part, une infection à VIH-2 semble retarder l'évolution de l'infection à VIH-1, ce qui a fait suggérer un rôle "protecteur" du VIH-2.

3-Variabilité et diagnostic biologique de l'infection à VIH.

3.1. Variabilité et Sérologie.

Il a été démontré que certains tests de dépistage VIH-1/VIH-2, notamment ceux utilisant des peptides synthétiques, étaient mis en défaut dans l'infection à VIH-1 groupe O (196, 295, 303). Ces variants hautement divergents présentent également des profils sérologiques atypiques au Western-Blot. Ces tests ont depuis lors été adaptés par l'adjonction soit de protéines recombinantes ou de peptides synthétiques croisant avec les virus O, soit d'antigènes spécifiques de ces virus.

Pour les virus du groupe M, leur diversité antigénique peut aussi être source de difficultés d'interprétation sérologique, principalement en cas de profonde immunodépression humorale, lors de la pré-séroconversion ou en cas de sérologie positive sans confirmation virologique.

Ces anomalies sont en grande partie dues au fait que la plupart des tests sérologiques de recherche d'anticorps et/ou d'antigène p24 soient basés sur le soustype B, d'où la nécessité de tenir compte des autres sous-types, tant dans la conception de ces tests que dans leur indispensable évaluation sur le terrain (15, 85). Même avec les tests de 4^{ème} génération, il existe des différences de sensibilité selon les variants VIH (200).

3.2-Variabilité et techniques de biologie moléculaire.

3.2.1-Influence sur la détection de l'ADN proviral par PCR.

La variabilité génétique pouvant être responsable d'une PCR faussement négative, il est parfois préconisé, lorsqu'il s'agit de poser un diagnostic, d'utiliser deux couples d'amorces hybridant au niveau des gènes *gag* et *pol* relativement bien conservés.

La trousse AMPLICOR HIV-DNA initiale, dont les amorces permettent l'amplification d'une partie du gène *gag*, ne permet pas détecter certains variants A, O et le VIH-2 (17, 24, 64, 195). Il y a soit variation de séquence aux sites d'appariement des amorces, soit simplement une insuffisance de matrice ADN proviral dans l'échantillon traité. *Respass et al* (273) ont proposé une version modifiée de ce test commercial qui leur a permis de détecter presque 100% des souches (140/141) comprenant des VIH-1 sous-types A à G et des souches du groupe O.

3.2.2-Influence sur la quantification de l'ARN viral plasmatique.

Les tests commerciaux de quantification de l'ARN viral plasmatique n'ont pas la même efficacité entre-eux, et selon le type ou le sous-type de VIH-1 (239).

Le test AMPLICOR HIV RNA MONITOR (Roche), amplifiant une séquence *gag*, est mis en défaut pour les virus du groupe O et le VIH-2 (195). De même, les résultats de ce test et ceux de la trousse NASBA Organon ne sont pas satisfaisants pour les sous-types non-B, particulièrement les variants A (5, 72, 195, 330).

Les sous-types E et F sont aussi mal quantifiés par le test AMPLICOR comparativement au test QUANTIPLEX bDNA (Chiron) (89). Les résultats obtenus avec ce dernier test dans les surnageants de culture de VIH-1, sous-types A à H, présentaient une bonne corrélation avec les quantifications d'antigène p24 dans les culots cellulaires (282).

Des versions améliorées du test AMPLICOR initial ont été réalisées et évaluées avec différents sous-types du groupe M : la version 1.5 a semblé la mieux adaptée (328). Le nouveau test LCx HIV RNA (Abbott) utilisant la *Real Time*-PCR couvre les variants des groupes M et O (29, 356). Cette méthode a été récemment

utilisée par *Damond et al (74)* pour quantifier la charge virale VIH-2, avec des résultats encourageants.

4-Variabilité et traitement antirétroviral.

Certains variants pourraient présenter une résistance naturelle à des antirétroviraux : les VIH-1 du groupe O vis à vis des INNTI (81, 82), certains isolats F vis à vis d'un autre INNTI, le TIBO R82913 (13).

Une moindre sensibilité vis à vis des antiprotéases a été également observée pour les sous-types C (336) et G (80, 336).

Le sous-type D semble acquérir plus facilement des mutations de résistance à la névirapine au cours du traitement préventif de la transmission mère-enfant (94). D'autre part, il a été décrit, chez des patients naïfs, de nombreuses souches VIH-1 ayant des mutations mineures conférant une résistance secondaire, tant au niveau de la protéase (257, 337) qu'à celui de la transcriptase inverse (337). Ces souches pourraient acquérir plus facilement une résistance sous traitement.

Signalons aussi que le VIH-2 est naturellement résistant aux INNTI et est moins sensible *in vitro* aux antiprotéases que le VIH-1 (81).

5-Variabilité et développement vaccinal.

La variabilité génétique du VIH, et subséquemment antigénique, constitue le principal obstacle à la mise au point d'un vaccin efficace (173), déficit majeur posé à la communauté scientifique. Outre la connaissance insuffisante du sens et des limites de cette variabilité, il y a celle non moins insuffisante des épitopes capables d'induire une réponse réellement protectrice. Les épitopes suspectés importants sont conformationnels. Il serait nécessaire d'identifier et d'utiliser les moins variables d'un sous-type à l'autre.

Le choix de l'immunogène reste donc posé : antigène dérivant d'une séquence consensus ou séquences ancestrales (110), cocktail antigénique représentant une certaine dégénérescence, sans écarter également la possibilité pour certaines

séquences non consensuelles d'induire une large réponse immune. Il n'y a pas encore de donnée suffisantes sur l'exploration des possibilités de protection croisée incluant le plus grand nombre de variants.

L'une des approches pour l'essai vaccinal consiste à préparer un immunogène correspondant au sous-type majoritaire dans la population-cible : par exemple une séquence consensus des CRF02-AG circulant en Côte d'Ivoire (90). Non seulement il n'est pas évident que tous les variants de ce sous-type soient atteints a fortiori les autres sous-types, mais sa prédominance dans la zone peut être révolue entre temps.

Plus de 30 candidats vaccins ont déjà été testés chez l'homme, au cours d'environ 70 études de phase I/II sur plus de 10 000 volontaires aux Etats-Unis, en Europe, en Chine, en Thaïlande, au Kenya et en Ouganda (112, 135). D'autres essais avec plusieurs modèles vaccinaux sont en cours à travers le monde, soutenus par l'IAVI (*International AIDS Vaccine Initiative*) et l'AAVI (*African AIDS Vaccine Initiative*). Les deux types de vaccins sont concernés :

-les vaccins préventifs classiquement connus et dont le premier essai en phase III avec AIDSVAX B/B n'a pas été très concluant. Un autre est en cours en Thaïlande avec AIDSVAX B/E (101).

-les vaccins thérapeutiques destinés à stimuler l'immunité cellulaire spécifique (CTL) pour retarder l'évolution de l'infection VIH vers la maladie, à l'instar des sujets VIH positifs non progressifs à long terme. Un essai ANRS de phase III pour ce type vaccin débutera bientôt au Sénégal.

Rappelons que l'important potentiel de recombinaison génétique du VIH a fait abandonner très tôt la stratégie d'un vaccin « vivant atténué ».

III-SIGNIFICATION ET LIMITES DE LA VARIABILITE DU VIH.

En général, la vitesse de propagation d'une épidémie virale chez l'homme est supérieure à celle de l'accumulation des mutations de ce virus. C'est la situation

contraire que l'observe dans le cas du VIH-1 puisque sa variabilité génétique évolue plus vite que l'expansion de l'infection. Cela pourrait être dû au fait que l'apparition du VIH-1 est un évènement écologique relativement récent, imposant ces changements qui ne sont que l'expression de la nécessaire quête d'adaptation au nouvel hôte.

Quant au VIH-2, il semble très avancé dans cette logique écologique. En effet, sa variabilité moins importante et sa faible pathogénicité peuvent être considérées comme la traduction d'une plus lointaine présence chez l'homme, donc d'une meilleure adaptation avec les populations infectées d'Afrique de l'Ouest. Cependant, la vitesse de propagation de ce virus en Inde semble beaucoup plus rapide qu'ailleurs, selon *Pfutzner et al (255)*.

Le maximum de variabilité est enregistré dans le gène *env* : c'est la traduction de la contre-sélection subie par les cibles majeures du système immunitaire que sont les glycoprotéines d'enveloppe. Mais le VIH présente une très grande fréquence de mutations non synonymes, non seulement dans le gène *env*, mais aussi dans les gènes de régulation. Cette particularité, qui doit avoir un rôle important dans la pathogénicité du virus, pourrait être le fait d'un phénomène d'échappement à la réponse immune cytotoxique par d'autres mécanismes d'adaptation inhérents aux rétrovirus (intégration, recombinaison).

Les données actuelles n'ont pas fini de révéler toutes les dimensions de la variabilité du VIH, ni quelles en sont les limites. Eu égard à la vision écologique de l'infection, ce virus évoluera-t-il vers une forme moins pathogène lorsque l'expansion de l'épidémie serait ralentie par les mesures de prévention de sa transmission naturelle?

IV-METHODES D'IDENTIFICATION DES VARIANTS VIH-1.

1-Identification des variants du groupe O.

Le dépistage des variants VIH-1 du groupe O se fait par ELISA utilisant un mélange de peptides synthétiques correspondant à la boucle V3 des souches O

initiales ANT70 et MVP5180. C'est le cas du test non commercial ELISA HIV O (Innogenetics, Antwerp, Belgium).

La confirmation de la séropositivité est réalisée par LIA utilisant des peptides synthétiques correspondant à la boucle V3 des VIH-1 groupe M et O, biotinylés et disposés en lignes parallèles sur des bandelettes de nylon. Un Western-Blot "maison" à base d'antigènes de la souche ANT70 peut compléter la confirmation, par la mise en évidence d'une réactivité gp120.

Mauclère et al (209) avaient développé et évalué deux GSEIA (*Group-Specific-Enzyme Immuno Assay*) qui sont des ELISA basés sur la compétition entre des peptides synthétiques correspondant soit à la boucle V3, soit aux domaines immunodominants de la gp41 des virus des groupes M et O.

2-Identification des variants VIH-1 du groupe M.

2.1-Technique HMA (*Heteroduplex Mobility Assay*).

Mise au point en 1993 et appliquée au génotypage du VIH-1 par *Delwart et al (78)*, la technique HMA repose sur la différence de mobilité électrophorétique entre les hétéroduplexes formés par l'appariement de deux brins d'ADN partiellement complémentaires et les homoduplexes issus de l'appariement de deux brins totalement complémentaires. Il y a en outre une relation semi-quantitative entre la mobilité des hétéroduplexes et le degré de divergence des séquences nucléotidiques.

Un segment d'ADN du gène *env* (ou *gag*) de la souche à génotyper est amplifié, puis mélangé avec une gamme d'ADN similaires obtenus à partir de plasmides de référence et correspondant aux différents sous-types. Après dénaturation, réappariements, séparation sur gel et révélation, la référence dont l'hétéroduplexe a le plus migré, donc ayant le plus de complémentarité avec la séquence inconnue, va déterminer le génotype de la souche étudiée.

Le HMA fournit des résultats acceptables, mais il faut continuellement adapter

les plasmides de référence pour couvrir la diversité mouvante du VIH-1 (197). Le développement de plasmides *gag* et la prise en compte de quelques recombinants ont donné un certain regain d'intérêt à cette technique (40, 133). Elle ne peut cependant pas atteindre le pouvoir discriminant du séquençage.

2.2-Séquençage et Analyse des séquences.

Le séquençage nucléotidique et l'analyse des séquences obtenues constituent la méthode de référence qui permet une classification plus précise des souches en sous-types, sous-sous-types et recombinants. Le degré d'exactitude augmente avec la taille du segment séquencé.

2.2.1-Séquençage.

2.2.1.1-Méthodes chimiques (Maxam et Gilbert).

Elles nécessitent de l'ADN purifié, sous forme simple brin, marqué au ^{32}P à une extrémité (5' en général), et réparti en quatre fractions qui subiront chacune une réaction chimique de coupure de brin 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 fois, et tous les fragments possibles seront obtenus en quantité équivalente. Après électrophorèse sur gel de polyacrylamide de résolution égale à une base, l'enchaînement des fragments sur les quatre pistes de l'autoradiogramme permet de déduire la séquence du brin traité.

Ces méthodes sont cependant de moins en moins utilisées. Elles permettent de déterminer des séquences de 100 à 200 bases par gel.

2.2.1.2-Méthodes enzymatiques (Sanger).

Elles sont basées sur l'obtention de 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 C₃, 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 ddNTP sont ajoutés en quantité faible par

rapport aux dNTPs, de sorte qu'il y ait 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.

- l'enzyme utilisée actuellement est une Taq polymérase qui permet d'opérer à température suffisamment élevée pour éviter la formation de structures secondaires du type "épingles à cheveux".

- le marquage peut être fait au ^{35}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 en 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 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.

2.2.2-Analyse des séquences : phylogénie moléculaire.

Elle permet non seulement une meilleure classification dans les trois groupes M, O et N, mais aussi la caractérisation de souches n'appartenant à aucun sous-type déjà décrit. L'analyse des divergences entre souches permet de réaliser un arbre phylogénétique caractérisé par deux paramètres:

-la topographie correspondant aux positions des noeuds: ancêtres communs "putatifs" à partir desquels se sont déroulés les événements évolutifs représentés sur l'arbre.

-la longueur qui est la somme des longueurs des branches (temps d'évolution).

Le logiciel Phylip (*Phylogeny Inference Program*) (97) est un recueil de programmes disponible au site <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html> et qui développe plusieurs algorithmes de phylogénie moléculaire:

-Méthode du plus proche voisin ou *Neighbor Joining* : décrite par *Saitou et Nei* en 1980 (290), c'est la plus utilisée, car elle permet une recherche séquentielle de taxons les plus proches, et de trouver très rapidement un arbre correct 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. On pourra tenir compte des critères d'homologie stricte ou d'homologie pondérée relativement à la transition, à la transversion et à la charge des acides aminés.

-Méthode de parcimonie : beaucoup plus lente, cette méthode regroupe les séquences selon les critères du nombre minimum d'événements génétiques (substitutions). Elle analyse tous les caractères et ne retient que les sites informatifs. Avec cette méthode, 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 séquences.

-Méthode du maximum de vraisemblance ou *Maximum Likelihood* : elle considère chaque position séparément pour fournir une estimation de la probabilité ou vraisemblance associée à chaque embranchement et à chaque distance entre deux noeuds. Toutes les topologies possibles sont examinées afin de retenir celle de l'arbre qui donne la vraisemblance maximale. Mais cette méthode est très lente et ne peut s'appliquer qu'à un petit nombre de taxons.

-Exploitation des différences mutations synonymes/mutations non

synonymes : le code génétique est tel qu'il y a une majorité de mutations non synonymes considérées généralement comme des positions non soumises à une pression de sélection. L'étude des distances pour l'analyse phylogénétique basée sur les mutations non synonymes permet en général d'écarter l'homoplasie, c'est à dire une similitude ou (ressemblance) non héritée d'un ancêtre commun. Cette homoplasie, qui influence fortement l'analyse des séquences du VIH, diffère de l'homologie qui correspond à une convergence évolutive.

Remarques:

-Quel que soit le procédé suivi, un arbre consensus de meilleure signification statistique peut être obtenu par la **méthode du Bootstrap**. Elle 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 noeud est "significatif" au risque 5% lorsqu'il est retrouvé dans au moins 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 SIVcpz.

2.3-Autres méthodes d'identification de soustypes.

Ces méthodes ont été utilisées dans certaines études, mais leur intérêt est limité actuellement.

2.3.1-Sérotypage.

Plusieurs techniques ont été proposées (60, 240), mais celle qui semble donner les meilleurs résultats fut décrite par *Barin et al (23)*: c'est la SSEIA (*Subtype Specific Enzyme Immuno-Assay*) qui est un ELISA en microplaque sensibilisées par un mélange équimolaire de cinq oligopeptides synthétiques correspondant aux

séquences V3 consensus des sous-types A à E. Le test est basé sur le principe de l'inhibition de la fixation d'anticorps anti-V3 relatifs à un sous-type donné, en présence d'un excès du peptide V3 correspondant.

Le sérotypage est interprétable dans 90% des cas. Les difficultés résultent principalement de:

- l'absence de réactivité par absence ou insuffisance d'anticorps (pré-séroconversion).

- l'existence de réactions croisées entre sous-types C et A, mais surtout entre C et E. Par contre, il y en a très peu avec le sous-type D, ce qui est en accord avec la grande divergence signalée par *Korber (174)* entre les séquences D et celles des autres sous-types. D'une façon générale, ces réactions croisées sont plus fréquentes avec les sérums d'Afrique Centrale (23, 259). Le sérotypage n'est pas concluant pour le VIH-2 (260).

2.3.2-Technique CoMA ou « Combinatorial DNA Melting Assay »

Cette technique est basée, comme le HMA, sur la formation d'hétéroduplex, et a été appliquée au génotypage du VIH-1 (178, 275) et du virus de l'hépatite C (178). La technique consiste à amplifier par PCR nichée, dans la région C2V4 du gène *env* (pour le VIH-1), un fragment d'ADN de 530 bp pour les souches de référence et pour les inconnues. Ces fragments serviront de matrice pour une PCR asymétrique utilisant :

- une amorce biotinyllée en 5' pour obtenir de l'ADN simple brin anti-sens biotinyllé correspondant à chaque référence. Les simples brins de chaque référence seront fixés au fond d'un puits d'une microplaque par liaison à la streptavidine préalablement coatée.

- une amorce marquée à la digoxigénine en 5' pour obtenir de l'ADN simple brin anti-sens lié à la digoxigénine et correspondant à la souche inconnue. Ces simples brins inconnus seront incubés à 75°C (pour augmenter la stringence des

appariements) avec les références pour former des hétéroduplexes de stabilité en rapport avec le degré de divergence entre la référence considérée et l'inconnue. Après lavage et incubation avec un anticorps anti-digoxigénine marqué à la phosphatase alcaline, puis avec le substrat, le sous-type correspond à la référence où le puits a un signal au moins deux fois plus élevé que dans tous les autres puits.

Pour donner une bonne concordance des résultats par rapport au séquençage (275, cette technique, comme le HMA, nécessite l'utilisation comme référence des souches connues provenant de la région concernée.

2.3.3-PCR spécifique du soustype A ou « PCR géno A ».

Développée par *Peeters et al (250)* en 1998, la PCR géno A consiste à amplifier un fragment ADN dans le gène *env* avec des amorces spécifiques du VIH-1 soustype A, ce qui permet un screening rapide d'échantillons provenant de régions où ce variant est très fréquent, en l'occurrence l'Afrique de l'Ouest et du Centre. Malgré une spécificité acceptable de 98,6%, ce test présente une moins bonne sensibilité, variant de 50 à 80% et inversement proportionnelle au degré de variabilité intra-sous-type plus élevé en Afrique Centrale.

2.3.4-Hybridation Moléculaire avec des Sondes Spécifiques.

Cette technique possède deux variantes :

-les sondes correspondant aux références sont marquées à la digoxigénine et mises chacune à hybrider avec les produits PCR de la souche inconnue préalablement immobilisés sur une membrane (315).

-les sondes ne sont pas marquées mais fixées dans les cupules de microplaque type ELISA. Les produits PCR peuvent être marqués (199) ou non. Dans ce dernier cas, la détection des hybrides formés utilise un anticorps monoclonal anti-ADN double brin suivi de réaction colorimétrique (261).

L'hybridation moléculaire a été utilisée, avec une bonne efficacité pour caractériser les sous-types dominants BTh et E en Thaïland par *Subbarao et al*

(315), ainsi que A et D en Ouganda par *Luo et al (199)*.

Heolscher et al (138) ont proposé et évalué la MHA (*Multi-region Hybridization Assay*) pour la caractérisation rapide des sous-types A, C, D circulant en Afrique de l'Est.

2.3.5-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).

Cette technique basée sur le polymorphisme de longueur des fragments de restriction consiste à faire agir des enzymes de restriction sur les produits PCR des souches inconnues et à comparer les profils électrophorétiques des fragments de digestion obtenus avec les profils de référence attendus pour chaque enzyme (AluI, HinfI, FokI...) et sous-type viral, par région génomique étudiée.

Très peu pratique pour les grandes séries, la RFLP a été utilisée pour le génotypage du VIH-1 par certains auteurs en Côte d'Ivoire (91, 229), en Afrique du Sud (335) et au Brésil (222).

3-Identification des variants du groupe N.

Le séquençage suivi d'analyse phylogénétique reste la seule méthode actuellement disponible pour caractériser ces variants récemment décrits (20, 304).

Deuxième Partie :
NOS TRAVAUX DE RECHERCHE

APERCU SUR LE NIGER ET CADRE DU TRAVAIL

I-APERCU SUR LE NIGER

Le Niger est un pays sahélo-saharien s'étendant sur 1 267 000 km², situé en Afrique de l'Ouest, enclavé, limité au Nord par l'Algérie et la Lybie, à l'Est par le Tchad, au Sud par le Nigéria et le Bénin, à l'Ouest par le Burkina Faso et le Mali.

La population, estimée à 11 227 000 habitants en 2001 (150), est majoritairement constituée d'agriculteurs sédentaires vivant dans la partie Sud, tandis que le Nord est occupé essentiellement par des éleveurs nomades. 48% a moins de 15 ans. Le taux de croissance est de 2,7%, tandis que ceux de naissance et de mortalité sont 49,95 ‰ et 22,25‰, respectivement.

Depuis son indépendance le 3 août 1960, et malgré ses ressources minières et agro-pastorales importantes, le Niger a toujours fait partie des cinq pays les plus pauvres du monde et les moins avancés en terme de développement humain.

Sur le plan sanitaire, le taux de couverture sanitaire est faible et estimé à 42% en 2002. Le personnel de santé est en règle générale insuffisant, ainsi que les moyens de fonctionnement à tous les niveaux de la pyramide sanitaire. En ce qui concerne la lutte contre le SIDA et les Infections Sexuellement Transmissibles (IST), une Coordination Inter-Sectorielle a été nouvellement mise en place pour mettre en œuvre les dispositions du Cadre Stratégique National de Lutte contre les IST/VIH/SIDA au Niger, adopté par le Gouvernement en juillet 2002. Il s'agit d'une organisation multidisciplinaire et décentralisée à tous les secteurs d'activité, qui doit orienter ses actions sur :

- la prévention, car les résultats de l'enquête nationale de prévalence du VIH/IST au Niger montrent une prévalence relativement faible de 0,87% en 2002 dans la population générale (52). Cette situation est tout à fait compatible un renforcement des messages de prévention.

- la production des données épidémiologiques fiables, permettant de mieux évaluer et d'ajuster les différentes stratégies. Les données très incomplètes de

l'ONUSIDA sur le Niger témoignent de cette nécessité. A ce propos, notons par exemple que l'estimation des personnes adultes vivant avec le VIH annonçant un effectif de 64 000 en fin 1999, n'a pu se faire pour 2001 et 2002 faute de données fiables.

-la conception et de la mise en œuvre d'une initiative d'accès aux antirétroviraux, selon une approche multidisciplinaire. Ce serait la meilleure illustration de l'engagement politique maintes fois réaffirmé. Un Centre de Traitement Ambulatoire (CTA), soutenu par la Croix Rouge Française, doit démarrer ses activités en avril 2003. Il est prévu une cohorte initiale d'environ 200 patients VIH positifs.

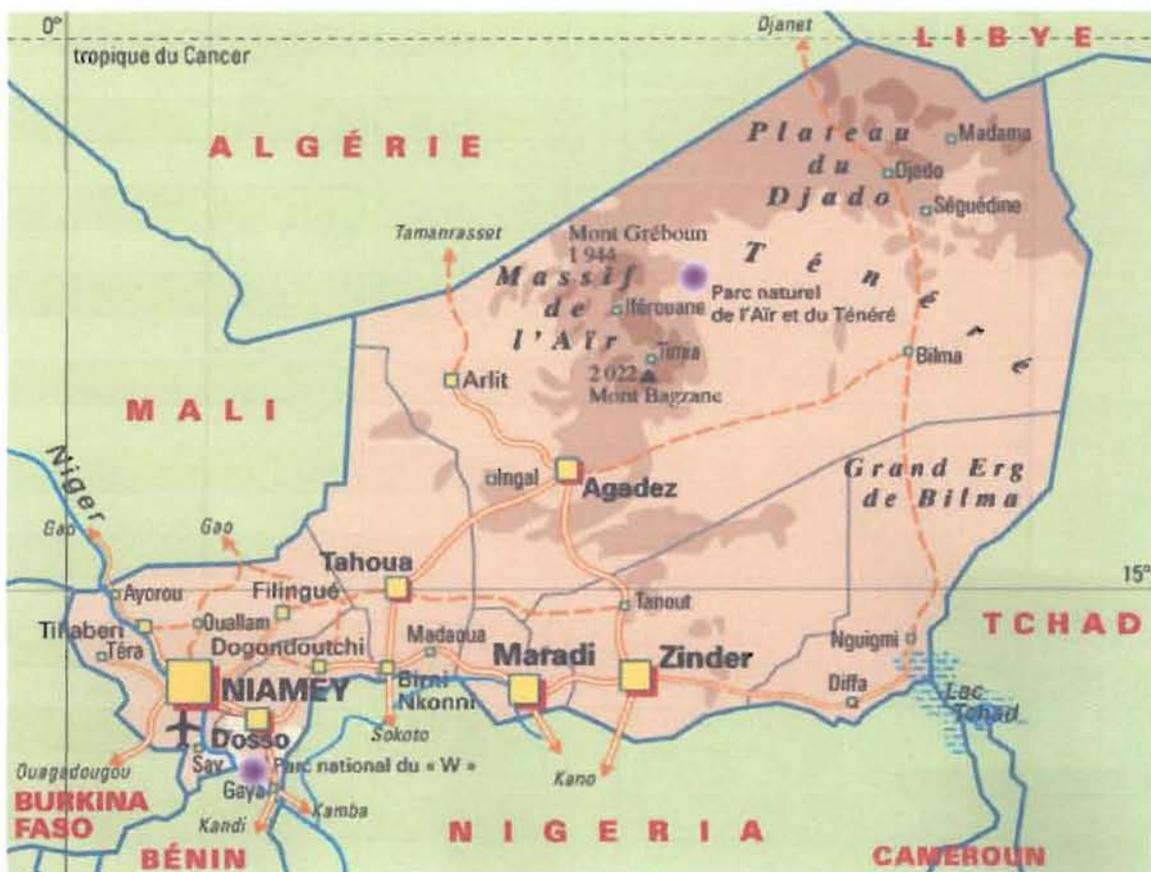


Figure 12 : Carte géographique du Niger. Les Coordinations Régionales de Lutte contre les IST/VIH/SIDA existent au niveaux des huit chef-lieux de régions : Agadez, Diffa, Dosso, Maradi, Tahoua, Tillabéry, Zinder et Niamey (capitale). La surface des carrés jaunes est proportionnelle au nombre d'habitants dans la localité.

II-CADRE DU TRAVAIL

Ce travail s'est déroulé au niveau de trois laboratoires, situés dans trois pays différents : Niger, Sénégal et France.

-le **Laboratoire de Biologie de l'Hôpital National de Niamey**, au Niger. Cette structure dispose d'une Unité de Sérologie Rétrovirale qui constitue le Centre National de Référence pour le VIH. A ce titre, une sérothèque comprenant des prélèvements de toutes les régions du pays est disponible, notamment pour d'éventuelles études rétrospectives. Nous intervenons dans cette structure dans le cadre de la composante hospitalière de notre fonction d'enseignant-chercheur à la Faculté des Sciences de la Santé l'Université Abdou Moumouni de Niamey.

Tous les prélèvements de sang total que nous avons collectés pour l'étude moléculaire du VIH-1 groupe M ont été traités dans ce laboratoire pour la séparation lymphocytaire. Tous les sérums ayant servi à l'étude du groupe O ont été sélectionnés également dans la sérothèque.

-le **Laboratoire de Bactériologie-Virologie du CHU Aristide Le Dantec de Dakar**, au Sénégal. Ce service coordonne tous les aspects biologiques des activités de recherche sur le SIDA au Sénégal. C'est un Centre Collaborateur OMS et ONUSIDA qui constitue un des rares pôles de référence dans ce domaine en Afrique. Il a initié de nombreux programmes de recherche en collaboration avec les pays du Nord, en associant d'autres pays africains. Cette stratégie Sud-Sud s'est renforcée avec la création du Réseau Africain de Recherche sur le SIDA (RARS) dont le siège est à Dakar.

Ce laboratoire dispose d'une Unité de Sérologie où nous avons effectué l'étude sur le VIH-1 du groupe O, en particulier le screening sérologique initial et la confirmation par LIA.

Depuis quelques années, une Unité de Biologie Moléculaire a été montée dans le cadre du projet SIDAK ; ses activités ont beaucoup contribué à la connaissance de

l'épidémiologie moléculaire du VIH au Sénégal et dans la Sous-Région, et vont bientôt se perfectionner et se diversifier à l'installation imminente d'un séquenceur automatique multicapillaire.

-le **Laboratoire des Rétrovirus, Unité de Recherche 036 « Prise en Charge du Sida en Afrique »**, de l'**Institut de Recherche pour le Développement (IRD) de Montpellier**, en France. Ce laboratoire travaille sur le VIH et d'autres rétrovirus en collaboration avec de nombreux pays africains, notamment dans le cadre de l'Action Coordonnée n°12 ANRS / Coopération Française. Il dispose d'une unité P3 pour les cultures virales et autres manipulations dangereuses. Les activités de biologie moléculaire prédominent, notamment les séquençages pour la phylogénie et l'étude des résistances aux ARV.

Durant nos multiples séjours, nous y avons effectué toute la composante biologie moléculaire de la présente thèse, au sein d'une équipe compétente et disponible.

**GENOTYPAGE DES SOUCHES DU VIH-1 GROUPE
M ET ANALYSE DE CERTAINS GENOMES
MOSAIQUES**

Publication N°1

**« Predominance of CRF02_AG and CRF06_cpx in Niger, West
Africa »**

(AIDS Res Hum Retroviruses, 2002; 18 (10): 723-726)

I-CONTEXTE

Comme sus-mentionné, le VIH-1 est caractérisé sur le plan génétique par sa grande variabilité. L'étude moléculaire de nombreuses souches d'origines géographiques diverses a permis de distinguer les trois groupes M, N et O. Actuellement, la majorité des souches décrites appartiennent au groupe M qui présente aussi la plus grande diversité génétique, avec 9 sous-types, des sous-sous-types, des CRF et divers autres recombinants.

La distribution de tous ces variants VIH-1 constitue un marqueur épidémiologique de l'infection à VIH. La nécessité de sa connaissance dans chaque région géographique tient aux différentes implications de la variabilité génétique sur la transmissibilité, la pathogénèse, le diagnostic, la sensibilité aux ARV et le développement vaccinal.

Le premier volet de nos travaux de thèse concerne l'exploration de cette diversité virale, à travers la caractérisation moléculaire de souches de VIH-1 groupe M circulant au Niger. Dans ce pays, aucune donnée n'était disponible sur cet aspect de la biologie du VIH avant notre travail qui s'inscrit dans le programme global d'étude de la diversité génétique du VIH en Afrique de l'Ouest et du Centre.

II-MATERIEL ET METHODES

La population d'étude est constituée de patients hospitalisés ou ayant consulté à l'Hôpital National de Niamey, pour lesquels une sérologie VIH a été demandée sur la base d'arguments cliniques ou pour un dépistage volontaire.

Pour les deux périodes de l'étude, n'étaient inclus que les sujets positifs pour lesquels l'on dispose des données socio-démographiques minimales. Ils ont tous bénéficié d'un second prélèvement de sang sur EDTA, en vue de la séparation en gradient de Ficoll des PBMC nécessaires à l'étude moléculaire.

Les PBMC et les plasmas étaient stockés sur place à -20°C jusqu'à leur acheminement à $+4^{\circ}\text{C}$ au laboratoire de Montpellier pour les analyses qui

comprennent :

- l'extraction d'ADN total des lymphocytes primaires avec le kit Isoquick (Microprobe) ou le kit QiaAmp DNA blood extraction (Qiagen).

- l'amplification par nested-PCR des régions V3V5 du gène *env* et p24 du gène *gag*. Pour *env*, nous avons utilisé les amorces externes ED5/ED12 et internes ES7/ES8, ou à défaut S1/S2 (externes) et ED5nig/ES8nig (internes). Pour *gag*, les amorces externes G00/G01 et internes G60/G25 ont été utilisées.

- la purification des amplicons sur gel d'agarose et avec le kit QiaQuick gel extraction (Qiagen).

- le séquençage des fragments purifiés en utilisant les amorces internes et les réactifs BigDye Terminator (Applied Biosystem).

- la purification des produits de réactions de séquence par précipitation à l'éthanol en présence de citrate de sodium.

- l'analyse des produits de séquence purifiés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 5% d'urée, au séquenceur automatique Applied 373 A Stretch (Applied Biosystem) qui collecte les données informatisées relatives à chaque brin d'ADN séquencé.

- la correction des séquences avec le logiciel SeqEd.

- l'alignement groupé ou unitaire de chaque type de séquences (*env* ou *gag*) avec les séquences homologues de référence, dans Clustal W (320). Les références utilisées correspondent aux différents sous-types « purs » et aux principaux CRF décrits en Afrique de l'Ouest et du Centre : CRF01-AE, CRF02_AG, CRF06_cpx et CRF11_cpx. Les alignements sont vérifiés manuellement, et des ajustements éventuels sont effectués pour tenir compte des cadres ouverts de lecture. Les zones incertaines et celles correspondant aux insertions/délétions sont exclues de l'analyse.

-l'analyse phylogénétique effectuée par la méthode du *neighbour-joining* (290) mise en œuvre dans Clustal W, et le calcul des distances génétiques par la méthode de Kimura à deux paramètres (169) dans DNADIST. Les arbres phylogénétiques sont dessinés avec le logiciel Treeview qui est disponible au site <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>.

III-RESULTATS

Les résultats de l'analyse phylogénétique des séquences *env* et *gag* révèlent que les 110 souches étudiées appartiennent à 14 variants génétiques différents de VIH-1 du groupe M :

→ les sous-sous-types « purs » A1 et A2

→ le sous-type « pur » G

→ le CRF02_AG et le CRF06_cpx,

→ des recombinants *env/gag* impliquant ces deux CRFs entre-eux ou le CRF02 avec des sous-types « purs » : CRF02_AG/CRF06_cpx, CRF06_cpx/CRF02_AG, CRF02_AG-A, A-CRF02_AG, CRF02_AG/B-D et G-CRF02_AG.

→ des recombinants inter-sous-types A/G, G/A et G/B-D.

Les arbres phylogénétiques réalisés avec les séquences partielles *env* et *gag* montrent que la grande majorité des souches se regroupent avec les références CRF02_AG et CRF06_cpx (figure 13).

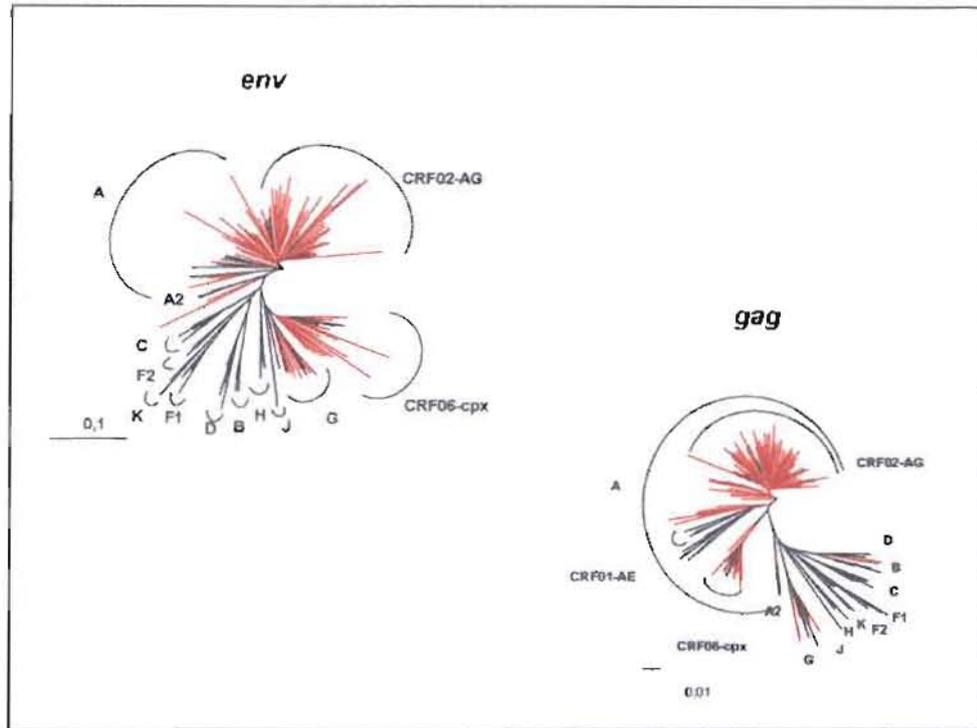


Figure 13: Arbres phylogénétiques avec les séquences partielles *env* et *gag* montrant la filiation génétique des 110 souches VIH-1 étudiées (traits rouges).

Les séquences de références (traits noirs) utilisées sont : A.UG.85.U455, A.KE.94.Q23, A.SE94.SE7253, A.UG.92.92UG037, A2.CY.94.94CY017.41, A2.CD.97CDKTB48, B.FR.83.HXB2, B.US.86.JRFL, B.US.90.WEAU160, B.US.83.RFC, BR.92.92BR025, C.ET.86.ETH.2220, C.BW.96.96BW0502, C.IN.95.95IN2106, D.CD.83.ELI, D.CD.83NDK, D.CD.84.84.ZR085, D.UG.94.94UG1141, F1.BR.93.93BR020, F1.BR.93.93BR.020.1, F1.BE.93.VI850, F1.FR.96.MP411, F2.CM.95.MP255, F2.CM.95.MP257, G.FI.93.HH8793-12.1, G.BE.96.DRCBL, G.SE.93.SE6165, G.NG.92.92NG083, H.BE.93.VI997, H.CF.90.90CF056, H.BE.93.VI991, J.SE.93.SE7887, J.SE.93.SE7022, K.CM.96.MP.535, K.CD.97.EQTB11C, CRF01-AE.CM240, CRF01-AE.93TH253, CRF01-AE.90CF402, CRF02-AG.IbNG, CRF02-AG.DJ263, CRF02-AG.DJ264.

La répartition globale montre la prédominance des CRF02_AG et CRF06_cpx qui représentent 54,3% et 18,1%, respectivement (figure 14).

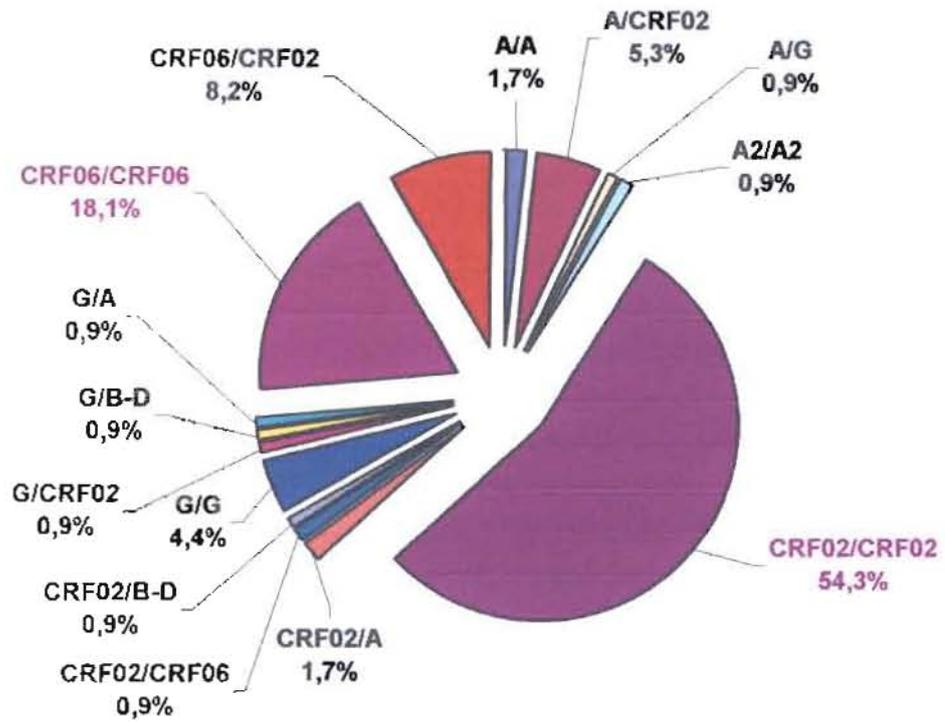


Figure 14 : Distribution globale des variants VIH-1 identifiés.

Il n'y a pas de différences statistiquement significatives dans la distribution d'un variant donné sur les deux années. Par contre, il y a une diversification de ces variants dont le nombre est passé de 7 en 1997 à 13 en 2000, ainsi qu'une augmentation de la proportion des recombinants inter-CRFs (figures 15 et 16).

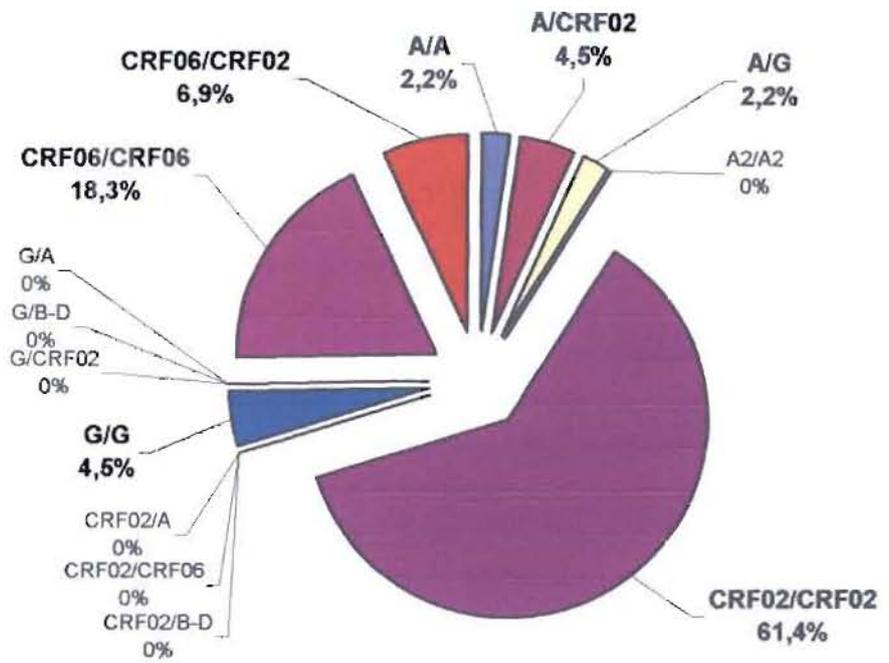


Figure 15 : Distribution des variants VIH-1 en 1997.

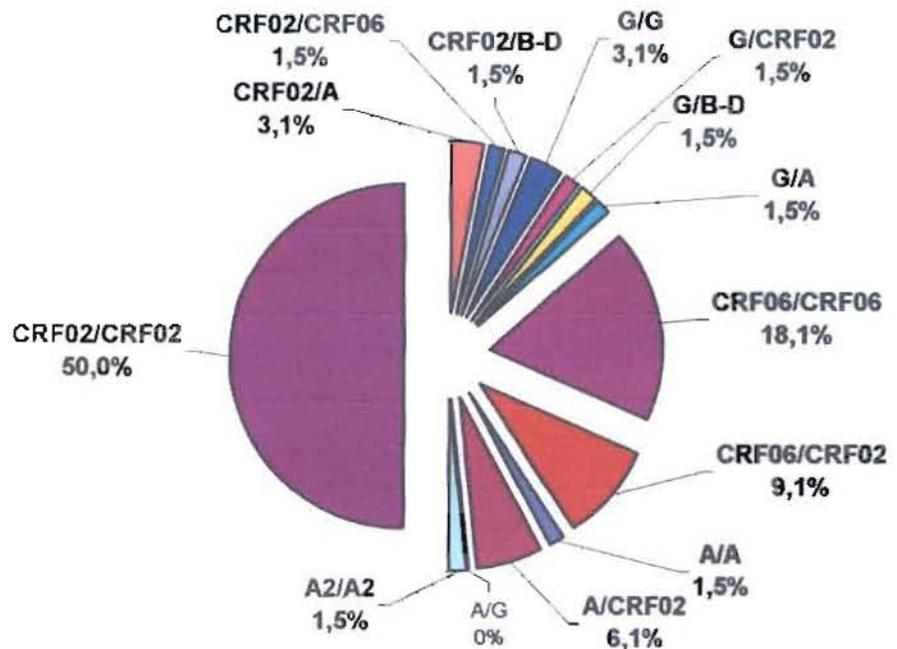


Figure 16 : Distribution des variants VIH-1 en 2000.

Cette grande diversité de variants viraux au sein d'un échantillon de 110 souches et dans un pays à séroprévalence inférieure à 1% en population générale (52), est une illustration du caractère dynamique du processus de recombinaison génétique du VIH-1.

Sequence Note

Predominance of CRF02-AG and CRF06-cpx in Niger, West Africa

SAIDOU MAMADOU,¹ CELINE MONTAVON,² AMINATA BEN,¹ ALI DJIBO,¹ SANATA RABIOU,¹
 SOULEYMANE MBOUP,³ ERIC DELAPORTE,² and MARTINE PEETERS²

ABSTRACT

A total of 110 HIV-1-positive samples obtained in 1997 ($n = 44$) and 2000 ($n = 66$) were genetically characterized in the V3-V5 envelope region and the p24 *gag* region. The majority of the strains were CRF02-AG (54.3%) or CRF06-cpx (18.1%) in *env* and *gag*. More than 9% of the samples were recombinants between CRF02 and CRF06; 9 were CRF06 in *env* but CRF02 in *gag*, and for one sample the opposite was seen. Overall for 23 (20.9%) samples, the subtype designation was different between *env* and *gag*, and in 20 of these 23 samples a CRF was involved in the recombination event. No significant differences were seen between subtype distributions in 1997 and 2000, except that the proportion of recombinants increased from 13.6% in 1997 to 27.2% in 2000.

PHYLOGENETIC ANALYSIS of numerous strains of HIV-1, isolated from diverse geographic origins, have revealed three distinct clades of viruses, which have been termed groups M, N, and O.¹ Group M, which is responsible for the pandemic, can be further subdivided into subtypes, subsubtypes, and circulating recombinant forms (CRFs).¹ Subtype designations have been powerful molecular epidemiological markers to track the course of the HIV-1 pandemic. Whether significant differences exist in pathogenesis or transmissibility has still to be determined. The degree to which vaccines based on one subtype will elicit cross-protection against other subtypes is still poorly understood, but there is well-established evidence that differences related to efficiency of diagnostic assays and antiretroviral drugs exist among the various HIV-1 variants. Therefore it remains important to track the molecular epidemiology of HIV-1 and to genetically characterize prevalent HIV-1 strains.

Niger is a sahel-Saharan country of 1.267 million square kilometers located between Algeria and Libya in the north, Chad in the east, Nigeria and Benin in the south, and Mali and Burkina Faso in the west. The population, 10.5 million inhabitants, live mainly in the southern part of the country and are farmers, whereas the northern people are nomadic breeders. Ni-

amey, the capital city, is the major urban area with nearly one million inhabitants in 2001. Few data have been published on the HIV/AIDS epidemic in Niger. Compared to neighboring countries in West Africa, HIV seroprevalences are relatively low. It was estimated that by the end of 1999, 64,000 adults and children were living with HIV/AIDS in Niger.² HIV surveillance information on antenatal clinic women is available since 1987-1988, and increased from 0.5% to 1.3% in 1993 in Niamey.² HIV seroprevalence rates among sex workers increased from 7.5% in 1987/88³ to 30.05% in 2000 (S. Mamadou, personal observation). Both AIDS viruses, HIV-1 and HIV-2, cocirculate in Niger, but as observed in other West African countries, HIV-2 prevalences remain low and stable or even decrease, whereas HIV-1 has become increasingly more common.^{3,4}

Since the emergence of the AIDS epidemic, no data on the HIV-1 genetic subtypes in Niger have been reported, only a case of HIV-1 group O infection was reported.⁵ We report here prevalences of different HIV-1 genetic subtypes circulating among patients who attended the national hospital of Niamey, the main health center of the country, in 1997 and 2000.

A total of 110 HIV-1-positive samples were genetically char-

¹National Hospital of Niamey, Niamey, Niger.

²UR36, Laboratoire Retrovirus, IRD and University of Montpellier I, Montpellier, France.

³Laboratoire de Bactériologie-Virologie, CHU Le Dantec, Dakar, Sénégal.

acterized in part of the *env* and *gag* regions, 100 from patients with clinical signs of AIDS-related disease and 8 from individuals who came voluntarily for HIV screening. Forty-four samples were collected in 1997 and 66 in 2000. In addition to the clinical examination, demographic characteristics and risk factors for HIV infection were collected. Among these 110 patients, the mean age was 34 years and ranged from 18 to 52 years, and about 43.5% were women. The main route of HIV transmission was heterosexual contact; homosexuality and transmission via blood transfusion were not documented. All of them were natives from Niger.

A 10-ml whole blood sample was collected from each individual on EDTA tubes. Peripheral mononuclear blood cells were separated from plasma by Ficoll gradient centrifugation. Plasma and cell pellets were stored at -20°C . DNA was extracted from the dry cell pellets using the IsoQuick isolation kit (Microprobe Corp, Garden Cove, CA) or the Qiagen DNA extraction kit (Qiagen SA, Courtabeuf, France). In the envelope, the genetic subtypes were determined in the V3-V5 region, by sequencing followed by phylogenetic analysis. Primers previously described for heteroduplex mobility analysis (HMA) were used to amplify this fragment, ED5-ED12 in the first round and ES7-ES8 in the second round.⁶ For a subset of samples that could not be amplified with the HMA primers, a fragment of approximately 1100 bp was amplified by a nested polymerase chain reaction using primers previously described in our study on subtypes in Nigeria: S1 and S2 as outer primers and ED5nig and ES8nig as inner primers.⁷ For the *gag* gene, the p24 region was sequenced. Amplifications were done with previously described primers, G00-G01 for the first round and G60-G25 for the second round.⁸ The purified PCR products from *env* and *gag* were directly sequenced using cycle sequencing and dye terminator methodologies (ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit with AmpliTaq FS DNA

polymerase, PE Biosystems, Warrington, England) according to the instructions of the manufacturer. Electrophoresis and data collection were done on an automatic DNA sequencer (model 373A Stretch, Applied Biosystems). Nucleotide sequences were aligned using CLUSTAL W⁹ with minor manual adjustments, bearing in mind the protein sequences. The newly determined HIV-1 *env* and *gag* sequences were aligned with known HIV-1 sequences representing the different genetic subtypes and reference strains from the CRFs documented in West and West Central Africa (CR01-AE, CRF02-AG, CRF06-cpx, and CRF11-cpx).¹⁰ Phylogenetic trees using the neighbor joining method¹¹ and reliability of the branching orders using the bootstrap approach were implemented by using CLUSTAL W. Genetic distances were calculated with the Kimura's two-parameter method.¹² To clearly identify whether a sequence belongs to a subgroup representing a CRF within a certain subtype, phylogenetic analysis was done for each sequence individually.

Table 1 summarizes the different combinations of *env-gag* subtypes observed, and also shows the numbers and percentages observed for each combination on samples from 1997, 2000, and the total. The majority of the strains belong to CRF02 or CRF06: 54.3% are classified as CRF02 in *env* and *gag* and 18.1% as CRF06 in both regions. Only two samples were subtype A in *env* and *gag*, four were subtype G in both regions, and one sample was classified as A2 subsubtype. Overall for 23 (20.9%) samples, the subtype designation was different between *env* and *gag*, and in 20 of these 23 samples a CRF was involved in the recombination event. More than 9% of the samples were recombinants between CRF02 and CRF06, i.e., 8.3% ($n = 9$) were CRF06 in *env* but CRF02 in *gag*, and for one sample (0.9%) the opposite was seen. CRF02 strains also recombined with A ($n = 8$), G ($n = 1$), or B/D ($n = 1$). Figure 1 illustrates that some strains cluster significantly with CRF06 in *env* and with CRF02 in *gag*. No significant differences were

TABLE 1. NUMBERS AND PERCENTAGES OBSERVED FOR EACH COMBINATION OF *env-gag* SUBTYPES FOR SAMPLES FROM 1997, 2000, AND THE TOTAL

Subtype <i>env/gag</i>	1997 ($n = 44$)		2000 ($n = 66$)		Total	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
A/A	1	2.2	1	1.5	2	1.7
A/CRF02	2	4.5	4	6.1	6	5.3
A/G	1	2.2	—	—	1	0.9
A2/A2	—	—	1	1.5	1	0.9
CRF02/CRF02	27	61.4	33	50.0	60	54.3
CRF02/A	—	—	2	3.1	2	1.7
CRF02/CRF06	—	—	1	1.5	1	0.9
CRF02/B-D	—	—	1	1.5	1	0.9
G/G	2	4.5	2	3.1	4	4.4
G/CRF02	—	—	1	1.5	1	0.9
G/B-D	—	—	1	1.5	1	0.9
G/A	—	—	1	1.5	1	0.9
CRF06/CRF06	8	18.3	12	18.1	20	18.1
CRF06/CRF02	3	6.9	6	9.1	9	8.2

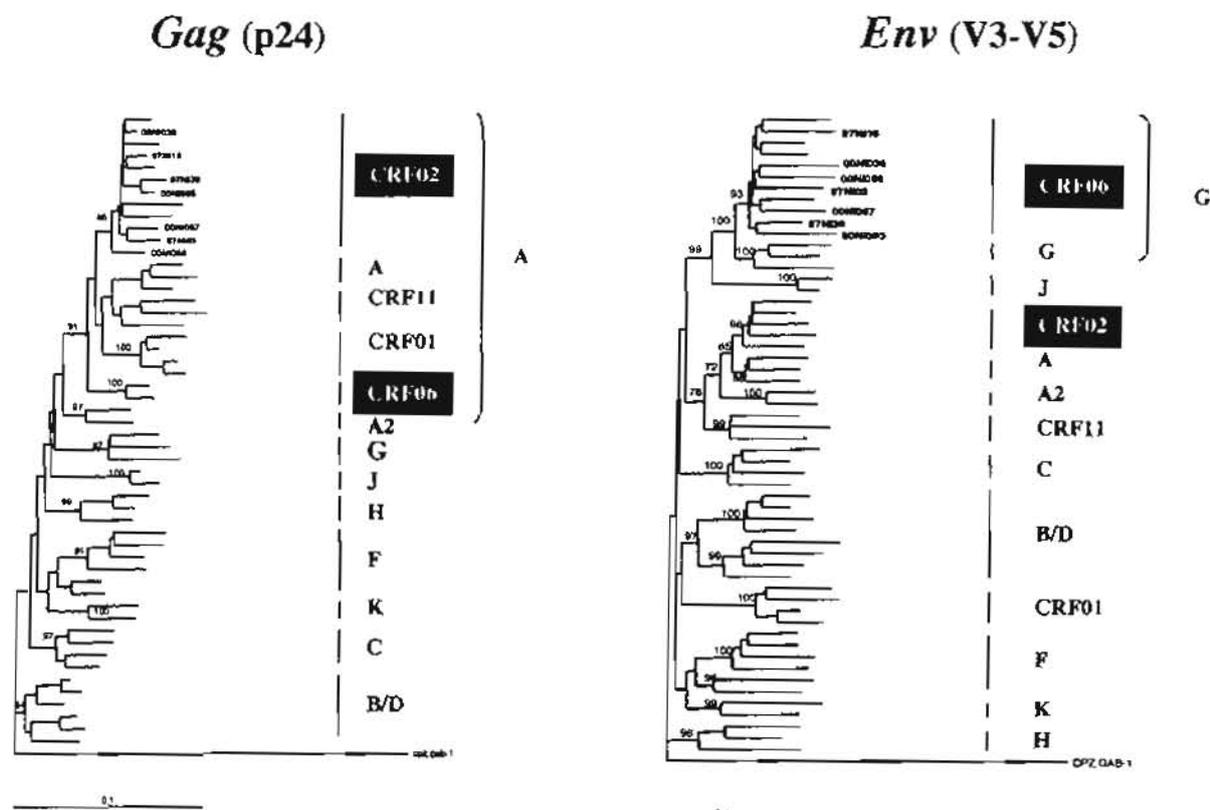


FIG. 1. Phylogenetic trees, confirming the different subtype designations, for *gag* CRF02-AG/*env* CRF06-cpx isolates. The new sequences were aligned with and compared to the following reference sequences: subtype A (92UG-UG037, 94SE-SE7523, and 94KE-Q23), subs subtype A2 (97CD-KTB48 and 94CY-017), subtype B (83US-RF, 90US-WEAU160, 86US-JRFL, and 83FR-HXB2), subtype C (86ET-ETH2220, 92BR-025, 96BW-0502, and 95IN-21068), subtype D (84CD-ZR085, 94UG-114, 83CD-NDK, and 83CD-ELI), subs subtype F1 (93BR-20, 93BE-VI850, 93FI-FIN9363, and 96FR-MP411), subs subtype F2 (95CM-MP255 and CM-MP257), subtype G (93SE-SE6165, 92NG-NG083, and 96DE-DRCL), subtype H (90CF-CF056, BE.VI991, and BE.VI997), subtype J (93SE-SE92809 and 93SE-SE91733), subtype K (97CD-EQTBI1 and 96CM-MP535), CRF01-AE (90CF-402, 90CF-4071, CM240, and 93TH-253), CRF02-AG (1BNG, DJ263, 99CM-MP1211, 99CM-MP1213, and 98CM-MP307), CRF06-cpx (95ML-127, 95ML-84, BFP90, and 97SE-1078), and CRF11-cpx (GR17, 98CM-MP818, and 99CF-MP1298).

seen between subtype distributions in 1997 and 2000, however it is important to note that the number of samples with discordant subtype or CRF designations between *env* and *gag* increased from 13.6% (6/44) in 1997 to 27.2% (18/66) in 2000.

As in many other West and West Central African countries, *env* subtype A and G strains are predominant.¹³ But more detailed phylogenetic analysis showed that the majority of *env* subtype A strains, 64 of the 75 (85.3%), cluster with the CRF02 prototype strains, and similarly 26 of the 33 (78.7%) *env* subtype G strains are in fact CRF06-cpx. The situation in Niger is therefore more complex than just subtypes A and G that are cocirculating; the predominant viruses are complex recombinants, especially CRF06, which is a mosaic virus of at least four subtypes, A, G, K, and J and some small unclassified fragments.¹⁴ In addition, the situation becomes even more complex, since CRF02 and CRF06 strains seem to recombine with each other and with other circulating subtypes. These data also clearly show that *env*-HMA, in the actual configuration, gives only limited information on HIV-1 group M

variants that circulate in Niger; *env*-HMA cannot discriminate either between pure subtype A and CRF02 or between pure subtype G and CRF06.¹⁵

This study on HIV-1 variants in Niger illustrates that subtype distribution is a dynamic and unpredictable process with an increasing number of viruses that recombine. The epidemic in Niger is dominated by CRF02 and CRF06, which recombine. The complexity of HIV-1 genomic structures will increase over time as the various subtypes and CRFs spread and lead to recombinants or new CRFs resulting from recombination events involving CRFs.

SEQUENCE DATA

The new sequences have been deposited in the GenBank Data Library under the following Accession Numbers: AJ429810 to AJ429921 for *env* and AJ429922 to AJ4230031 for *gag*.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was sponsored by grants from the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS, Projet Sidak). Céline Montavon received a doctoral fellowship from ANRS.

REFERENCES

- Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, et al.: HIV-1 nomenclature proposal. In: *Human Retroviruses and AIDS 1999* (Kuiken CL, Foley B, Hahn B, Korber B, McCutchan F, Marx PA, Mellors JW, Mullins JI, Sodroski J, and Wolinsky S, eds.). Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, 1999, pp. 492-505.
- Joint United Nations Programme on HIV/AIDS: Global HIV/AIDS and STD surveillance. Epi fact sheets by country—June 2000. (http://www.unaids.org/hiv/aidsinfo/statistics/fact-sheets/pdf/Niger_en.pdf)
- Ousseini H, Pecarrere JL, Meynard D, Abouou R, and Adamou H: Evolution de la séroprévalence des infections à VIH1 et VIH2 à l'Hôpital National de Niamey, Niger. *Bull Soc Path Ex* 1991;84: 235-239.
- Marlink R: Lessons from the second AIDS virus, HIV-2 1996. *AIDS* 1996;10:689-699.
- Bibollet-Ruche F, Peeters M, Mboup S, et al.: Molecular characterization of the envelope transmembrane glycoprotein of 13 new human immunodeficiency virus type 1 group O strains from six different African countries. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998;14:1281-1285.
- Delwart EL, Shpaer EG, Louwagie J, et al.: Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: Analysis of HIV-1 *env* genes. *Science* 1993;262:1257-1261.
- Peeters M, Esu-Williams E, Vergne L, et al.: Predominance of subtype A and G human immunodeficiency virus type 1 in Nigeria with geographical differences in their distribution. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000;16:315-325.
- Sanders-Buell E, Salminen MO, and McCutchan FE: Sequencing primers for HIV-1. In: *Human Retroviruses and Aids*. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico, 1995, pp. III15-III21.
- Thompson JD, Higgins DG, and Gibson TJ: CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;22:4673-4680.
- Peeters M: Recombinant HIV sequences: Their role in the global epidemic. In: *Human Retroviruses and AIDS 2000: A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences* (Kuiken CL, Foley B, Hahn B, Korber B, McCutchan F, Marx PA, Mellors JW, Mullins JI, Sodroski J, and Wolinsky S, eds.). Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, 2000, pp. 39-54.
- Saitou N and Nei M: The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406-425.
- Kimura M: A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. *J Mol Evol* 1980;16:111-120.
- Montavon C, Toure-Kane C, Liegeois F, et al.: The majority of *env* and *gag* subtype A HIV-1 viruses circulating in west and west central Africa are similar to the prototype AG recombinant virus, IBNG. *J AIDS* 2000;23:363-374.
- Montavon C, Toure-Kane C, Nkengasong J, Vergne L, Hertogs K, Mboup S, Delaporte E, and Peeters M: CRF06_cpx: A new circulating recombinant form of HIV-1 in West Africa, involving subtypes, A, G, K and J. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002;29: 522-530.
- Heyndrickx L, Janssens W, Zekeng L, et al.: Simplified strategy for detection of recombinant human immunodeficiency virus type 1 group M isolates by gag/env heteroduplex mobility assay. *Study Group on Heterogeneity of HIV Epidemics in African Cities*. *J Virol* 2000;74(11):363-370.

Address reprint requests to:

Martine Peeters

UK36, Laboratoire Retrovirus
IRD, 911 Avenue Agropolis, BP 5045
34032 Montpellier Cedex 1, France

E-mail: martine.peeters@mpl.ird.fr

Publication N°2

« A propos d'une association VIH et noma au Niger »

(Bull Soc Path ex, 2002 ; 95 (2) : 76-77)

Oublié au Nord et sévissant encore au Sud, le noma ou *Cancrum oris* est une affection oro-faciale nécrosante, mutilante et défigurante. Sur le plan étiologique, il semble établi qu'il s'agit d'infections à bactéries anaérobies strictes, notamment le *Fusobacterium necrophorum*, dans un contexte de carences nutritionnelles et de mauvaise hygiène bucco-dentaire (96). Il survient essentiellement chez les enfants de moins de 6 ans, vivant dans des conditions socio-économiques précaires (93).

Une des deux souches génotypées « sous-type G » dans la série de l'année 2000 provenait d'une patiente adulte de 21 ans développant un noma actif. De ce fait, nous avons jugé opportun de mentionner ce cas d'association entre l'infection à VIH et un noma d'adulte, car très peu de données sur ce thème sont disponibles dans la littérature (63, 227). L'insuffisance du plateau technique local ne nous a pas permis de déterminer le taux de lymphocytes CD4+ pour apprécier l'état immunitaire de notre patiente qui décéda quelques mois plus tard.

Un programme national de lutte contre le noma soutenu par l'OMS existe dans quelques pays du Sud, dont le Niger où la première enquête épidémiologique nationale sur le noma fut réalisée (235). Nous avons suggéré au programme nigérien l'inclusion du dépistage systématique de l'infection à VIH pour tous les cas de noma, surtout chez l'adulte, afin d'évaluer les interactions entre ces deux problèmes de santé publique. L'étude devra tenir compte de l'existence des infections parodontales et autres stomatites gangréneuses observables au cours du SIDA.

À propos d'une association VIH et noma au Niger.

S. Mamadou (1), M. Kaka (2), C. Montavon (3), Y. Noman (4), M. Maty (4), E. Delaporte (3) & S. Mboup (5)

(1) Hôpital national de Niamey, BP 238, Niamey, Niger

(2) Coordonnateur du Programme national de lutte contre le noma, Niamey, Niger

(3) UR036, IRD Montpellier, BP 5045 34032 Montpellier, France

(4) Centre hospitalier régional de Maradi, Niger

(5) CHU-Le Dantec, BP 7325, Dakar, Senegal

Louise n° 1: 2372 "Clinique" Reçue le 30 octobre 2001. Acceptée le 7 mai 2002

Summary: About an association between HIV and noma in Niger (short report).

We report a case of noma having occurred in an adult female patient with HIV. The strain was characterized as HIV-1 group M subtype G. In order to explore the interactions between HIV/AIDS and this disease, we propose a systematic HIV screening for any case of noma, especially for adult patients.

Résumé

Nous rapportons un cas de noma chez une adulte infectée par le VIH. La souche est un VIH-1 groupe M sous-type G. Afin d'explorer les interactions entre le VIH/sida et cette maladie, nous proposons une sérologie systématique pour chaque cas de noma, surtout chez l'adulte.

HIV
subtype G
noma
adult
Niger
Sub-Saharan Africa

VIH
sous-type G
noma
adulte
Niger
Afrique intertropicale

Le *Cancrum oris*, communément appelé noma (du grec *nomemai* = dévorer), est une affection stomatologique mutuelle, d'étiologie bactérienne mal définie, débutant par une gingivite ulcéro-nécrotique aigue qui évolue rapidement en gangrène oro-faciale défigurante. Il survient surtout chez des enfants de moins de six ans vivant dans des conditions socio-économiques précaires, exposés à des déficiences nutritionnelles chroniques et ayant une mauvaise hygiène bucco-dentaire. Des études étiologiques récentes (3) rapportent l'implication de bactéries anaérobies strictes, notamment le *Fusobacterium necrophorum*. L'incidence annuelle serait de 2 à 10 pour 10 000 en Afrique subsaharienne (5).

Nous rapportons ici un cas de noma de l'adulte, survenu chez une patiente de 21 ans infectée par le VIH et hospitalisée, en novembre 2000, au Centre hospitalier régional de Maradi, Niger. À l'interrogatoire, cette ménagère divorcée depuis trois ans affirme avoir des partenaires sexuels occasionnels. De même, l'extension très rapide de la nécrose initiale sur la joue gauche laissant découvrir toute la mâchoire inférieure en deux semaines (photo non réalisée), ainsi que le mauvais état général, ont conduit à pratiquer une sérologie VIH qui s'est avérée positive au test ImmunoComb HIV Bispot[®] (PBS Origenes). La présence d'anticorps anti-VIH-1 groupe M a été confirmée avec le test INNO-LIA HIV Confirmation (Inogenetics). La numération lymphocytaire T4/18 n'est pas encore réalisable au Niger. Le long délai de transport n'a pas

permis d'envisager d'effectuer ce dosage à Montpellier ou, au contraire, nous avons génotypé la souche virale comme étant un sous-type G, à partir des séquences obtenues dans la région VAV5 du gène *env* avec les amorces S1ng-S2ng (externes) et ED5ng/LS8ng (internes), et dans la région p24 du gène *gag* avec les amorces G60-G61 (externes) et G25/G60 (internes). Bien que la première enquête épidémiologique nationale sur le noma ait été réalisée au Niger (5), aucune donnée n'est disponible sur l'association entre l'infection par le VIH et cette maladie qui, du fait de sa composante infectieuse, est favorisée par un déficit immunitaire quelle qu'en soit l'origine (2). Huit cas de noma ont été décrits chez des patients VIH positifs, au Zimbabwe, par Chiodo *et al.*, en 1996 (1); d'autres cas ont été rapportés chez des enfants en Zambie, par NACH et Jovic, en 1998 (4). Dans les deux études, les génotypes en cause n'ont pas été déterminés, mais, en demeurant, cette précaution est secondaire car tous les génotypes induisent l'immuno-déficience, principal lien possible entre le VIH et le noma.

Tout en ayant à l'esprit l'existence d'infections parodontales et autres stomatites gangréneuses observables au cours du sida, nous estimons que les interactions entre le VIH/sida et le noma doivent être explorées. Il serait de ce fait utile de pratiquer une sérologie VIH systématique chez toutes les personnes atteintes de noma, particulièrement lorsqu'il s'agit d'adultes.

Références bibliographiques

1. CHIDZONGA MM - Noma (*Cancrum oris*) in human immunodeficiency virus/acquired immune deficiency syndrome patients: report of eight cases. *J Oral Maxillofac Surg*, 1996, **54**, 1056-1060.
2. ENWONWU CD, FALKLER WA Jr, IDIGBE EO & SAVAGE KO - Noma (*Cancrum oris*): questions and answers. *Oral Dis*, 1999, **5**, 144-149.
3. FALKLER WA Jr, ENWONWU CO & IDIGBE EO - Microbiological understandings and mysteries of noma (*Cancrum oris*). *Oral Dis*, 1999, **5**, 150-155.
4. NATH S & JOVIC G - *Cancrum oris*: management, incidence and implications of human immuno-deficiency virus in Zambia. *Plast Reconstr Surg*, 1998, **102**, 350-357.
5. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE - *Cancrum oris* network action. *Noma Contact, Org mond santé, Genève, Suisse*, 1997, **1**, 1-8.

I-CONTEXTE

Après les résultats globaux et l'analyse de la distribution des variants VIH-1 groupe M circulant au Niger, nous avons envisagé d'étudier en détail les caractéristiques moléculaires des recombinants de deuxième génération représentant 9,1% des souches et impliquant les deux variants majoritaires CRF02_AG et CRF06_cpx.

Il s'agit de rechercher l'existence de similitudes moléculaires en faveur de l'émergence d'un recombinant unique à structure mosaïque complexe qui pourrait diffuser secondairement et constituer un autre CRF.

II-MATERIEL ET METHODES

Nous avons étudié trois souches recombinantes CRF02_AG/CRF06_cpx (gag/env) pour lesquelles l'ADN proviral était disponible en quantité suffisante, et qui provenaient de trois patients non liés épidémiologiquement.

Les séquences génomiques complètes ont été obtenues en procédant par des *nested-PCR* comme précédemment décrit (218, 220). Toutes les amorces utilisées (tableau X) sont sélectionnées en fonction de leur site d'appariement sur le génome du VIH-1 (figure 17). On effectue un nombre limité de premiers rounds utilisant des amorces choisies de façon à amplifier un fragments génomiques suffisamment longs pour permettre plusieurs seconds rounds afin de générer plusieurs petits fragments chevauchants à séquencer.

Avec le programme Seqed, toutes les séquences obtenues sont disposées de façon à superposer les parties chevauchantes. La séquence consensus de l'ensemble correspond à la séquence génomique.

Amorce	Séquence	Sens	Région
Env A	GGCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAA	S	env
G00	GACTAGCGGAGGCTAGAAG	S	gag
Inner5	CTGCAGGACAGATAGGGTTATAGAA	S	env
LPBS	AAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGAC	S	PBS
Mrev	TAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTA	S	env
polM2	GATTTGTATGTAGGATCTGA	S	pol
polM3	TATGTAGATGGGGAGCTAATAG	S	pol
Vif1	GGGTTTATTACAGGGACAGCAGAG	S	pol
41-1	GGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCG	S	env
4235	CCCTACAATCCCCAAAGTCAAGG	S	pol
Env N	CTGCCATTGAGGGAAGTAGCCTTGT	AS	env
G01	AGGGGTCTGTTGCCAAAGA	AS	gag
IN3	TCTATTCCATCCTAAAATAGTACTTTCTGATTCC	AS	pol
Lsig1	TCAAGGCAAGCTTTATTGAGGCTTAAGCAG	AS	LTR
M-Vpu3	TACTATRGTCACACAACACTAT	AS	vpu
polM8	CTGTATATCATTGACAGTCCAG	AS	pol
Vpu1	GGTTGGGGTCTGTGGGTACACAGG	AS	env
Outer 3	AGCATCTGAGGGTTAGCCACT	AS	nef
41-4	TCTGAAACGACAGAGGTGAGTATCCCTGCCTAA	AS	env
4481	GCTGTCCCTGTAATAAACCCG	AS	pol
4538	TACTGCCCTTCACCTTTCCA	AS	pol

S : sens AS : antisens

Tableau X : Amorces utilisées pour le séquençage génomique complet.

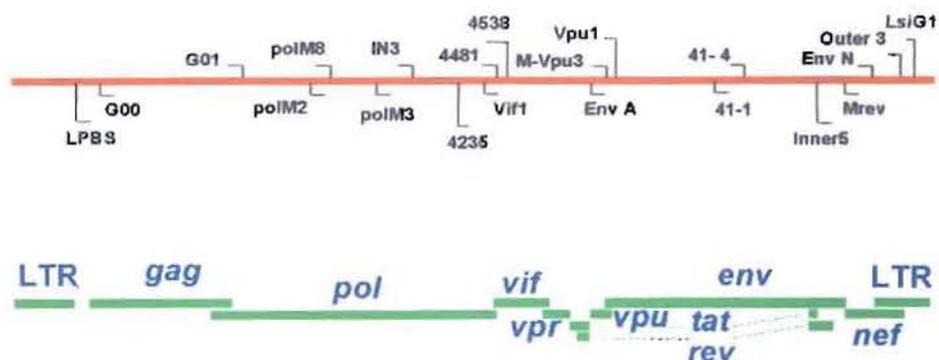


Figure 17: Positions d'appariement des amorces utilisées le long du génome VIH-1.

Les analyses comparatives de similarité ont été effectuées pour chaque génome, après alignement avec les séquences génomiques complètes des sous-types « purs », puis avec celles du CRF02_AG et du CRF06_cpx. Une confirmation de l'appartenance phylogénétique de tous les segments génomiques individualisés a été faite.

III-RESULTATS

Les trois souches ont une structure génomique mosaïque correspondant bien à une recombinaison entre le CRF02_AG et le CRF06_cpx.

Cette recombinaison est survenue à des positions différentes le long de chaque génome, engendrant de ce fait des virus complexes et différents entre-eux. C'est une illustration de l'importance des recombinaisons dans la diversification génétique du VIH, favorisées par la fréquence non négligeable des co-infections (18, 50, 146) et des super-infections (121, 153, 267), surtout dans les régions comme le Niger où plusieurs variants VIH-1 co-circulent.

Les trois séquences génomiques sont référencées dans la base de données EMBL, sous les numéros d'accèsion AJ508595 (97NE-003), AJ508596 (00NE095) et AJ508597 (00NE036).

Sequence Note

Emergence of Complex and Diverse CRF02-AG/CRF06-cpx Recombinant HIV Type 1 Strains in Niger, West Africa

SAIDOU MAMADOU,¹ NICOLE VIDAL,² CELINE MONTAVON,² AMINATA BEN,¹
 ALI DJIBO,¹ SANATA RABIOU,¹ GARBA SOGA,³ ERIC DELAPORTE,² SOULEYMANE MBOUP,⁴
 and MARTINE PEETERS²

ABSTRACT

On the basis of partial *env* and *gag* subtyping, we documented that the majority of HIV-1 strains circulating in Niger were CRF02-AG (54.3%) or CRF06-cpx (18.1%) and that 9% of the samples were possible recombinants between CRF02 and CRF06. To determine in more detail the precise structure of these viruses we sequenced the full-length genomes for three such strains (97NE-003, 00NE-036, and 00NE-095). From the bootscan and phylogenetic tree analysis it is evident that the new viruses are the result of recombination events between CRF02-AG and CRF06-cpx strains. Importantly, each virus had a different complex recombinant structure with multiple breakpoints, leading to viruses with complex mosaic patterns.

PHYLOGENETIC ANALYSIS of numerous strains of HIV-1, isolated from diverse geographic origins, has revealed that they can be further subdivided into groups (M, N, and O), subtypes (A-D, F-H, J, and K), subsubtypes, and circulating recombinant forms (CRFs, CRF01-CRF14). Subtype designations have provided powerful molecular epidemiological markers in tracking the course of the HIV-1 pandemic.¹ The global subtype distribution is heterogeneous and the greatest genetic diversity of HIV-1 has been found in Africa, especially Central Africa, where all groups and subtypes are found. Also within Africa, important differences are observed according to the regions studied, from country to country, and even within a country.^{2,3}

Overall, in South and East Africa subtype C predominates, and in West and West Central Africa, the majority of viruses are CRF02-AG. We described a new circulating recombinant form, CRF06-cpx, which circulates in several West African countries such as Niger, Nigeria, Burkina Faso, Mali, Senegal, and Ivory Coast.^{4,5} We also documented the high prevalence of this strain in Niger and Burkina Faso, where 18 to 50%, re-

spectively, of HIV-1 infections among AIDS patients are with the CRF06-cpx variant.^{6,7} In both countries, the other predominant circulating strain is CRF02-AG, 54% in Niger and 30% in Burkina Faso. In areas where CRFs have a high prevalence, it is highly probable that, like pure subtypes, they are also involved in recombination events. Indeed, 9-10% of the samples studied in the two countries mentioned above had discordant CRF designations between *env* and *gag*, with some samples being CRF02 in *env* and CRF06 in *gag* or the opposite.^{6,7} To determine in more detail the precise structure of these viruses we sequenced the full-length genomes of three such strains for which additional material was available. The three viruses studied were from AIDS patients who attended the national hospital of Niamey, the main health center in Niger, in 1997 (97NE-003) and 2000 (00NE-036 and 00NE-095). There was no epidemiological link between the three patients.

DNA was extracted from primary peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with the QIAamp DNA blood kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). For each strain, overlapping nested poly-

¹National Hospital of Niamey, Niger.

²UR36, Laboratoire Retrovirus, IRD and University of Montpellier I, Montpellier, France.

³Diseases Prevention and Control, WHO-Niger.

⁴Laboratoire de Bactériologie-Virologie, CHU Le Dantec, Dakar, Senegal.

merase chain reactions (PCRs) were done to obtain the sequence of the entire genome as previously described.^{4,5} The Boehringer Expand Long Template DNA polymerase (Roche Diagnostic, Meylan, France) was used according to the instructions of the manufacturer. The amplified products were purified using a QI-Aquik gel extraction kit (Qiagen). Nucleotide sequences were obtained by direct sequencing of the amplified DNA, using the inner primers of each PCR and several primers encompassing the entire fragments. The sequenced fragments were assembled into contiguous sequences and a consensus of the strands was formed by using the Seqed program (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France).

The three HIV-1 genomes were sequenced in their entirety, including the long terminal repeat (LTR) extremities, 9794 bp for 97NE-003, 9730 bp for 00NE-036, and 9698 bp for 00NE-095. All reading frames were open and of complete length. None of the genomes had major deletions or rearrangements.

The phylogenetic relationships of the newly derived viruses were estimated by sequence comparisons with previously reported representatives of group M subtypes (A–D, F–H, J, and K) and CRFs documented in West and West Central Africa available from the Los Alamos HIV Sequence Database (<http://hiv-web.lanl.gov>). Nucleotide sequences of the nearly full-length genomes were aligned using CLUSTAL W⁸ with minor manual adjustments, bearing in mind the protein sequences. Sites where there was a gap in any of the sequences, as well as areas of uncertain alignment, were excluded from all sequence comparisons. To analyze the recombinant structure of the new viruses, similarity and bootstrap plots were performed, using the SimPlot 2.5 software written by S. Ray and distributed by the author at <http://www.med.jhu.edu/leptmed/sray/>. For the bootscan plots, the SimPlot software performed bootscanning on neighbor-joining trees by using SEQBOOT, DNADIST, NEIGHBOR, and CONSENSUS from the PHYLIP package (available at <http://evolution.genetics.washington.edu/phylyp.html>) for a 500-bp window moving along the alignment with increments of 10 bp.

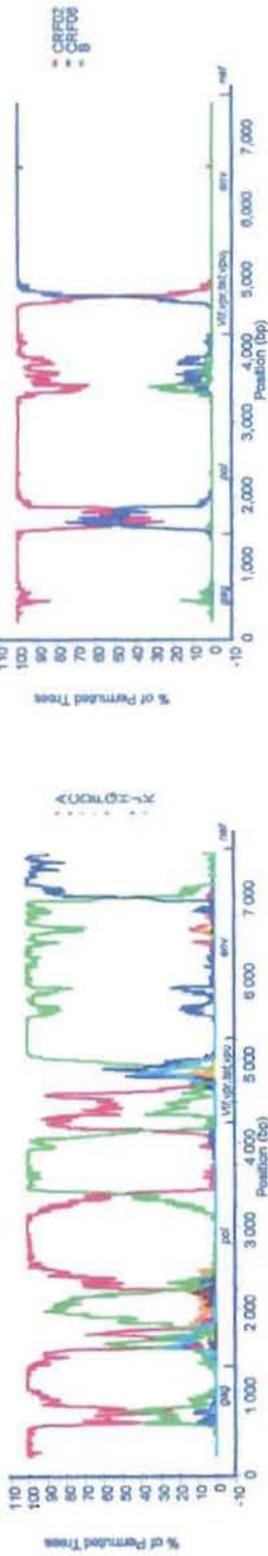
When the new sequences were plotted against references of all the nonrecombinant subtypes, we observed for the three sequences disproportionate levels of sequence identity with subtype A, G, J, and K along their genome. The same subtypes were also involved in the mosaic structure of CRF02-AG and CRF06-cpx (A, G, J, and K). The patterns of sequence homology with the above-mentioned subtypes were not similar among

the three viruses, suggesting three different mosaic genomes (Fig. 1a, c, and e). Because only the subtypes present in CRF02-AG and CRF06-cpx were observed, it was highly probable that these new strains are the result of recombination events between CRF02 and CRF06, the two predominant HIV-1 variants documented so far in Niger. To verify this hypothesis, we performed bootscan analyses of the new strains against CRF02 and CRF06 reference strains (Fig. 1b, d, and f). The bootscan results show alternating segments clustering with CRF02 and CRF06, but as expected from the previous bootscan results, for each virus a different pattern was seen. The different CRF designations, as indicated by the bootscan plots against CRF02 and CRF06 reference strains, were further analyzed by phylogenetic tree analysis as shown in Fig. 2. The full-length genome alignment was broken into different independent fragments corresponding to the inferred recombinant regions shown in Fig. 1b, d, and f. This analysis confirmed the breakpoints and CRF designations for each strain, with the exception of some small fragments for which the subtype/CRF assignment was not supported with significant bootstrap values. From the bootscan and phylogenetic tree analysis it is evident that the new viruses are the result of recombination events between CRF02 and CRF06 strains. Figure 3 summarizes the mosaic genomic structure of the three CRF02/CRF06 viruses from Niger.

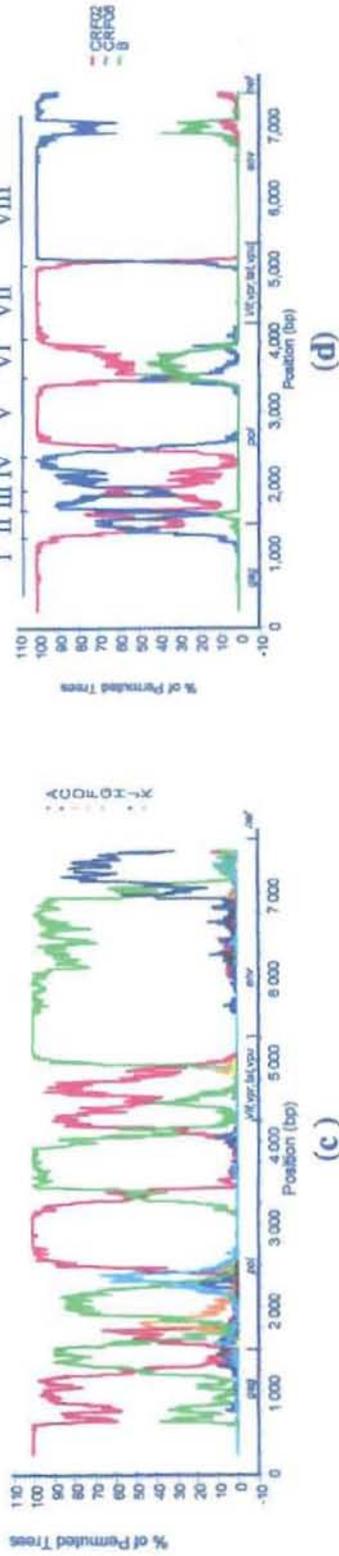
This study shows clearly that HIV variants are permanently evolving and that subtype distribution is a dynamic process. The two predominant HIV-1 variants, CRF02 and CRF06, that cocirculate in Niger recombined. CRF02/CR06 recombinants were already present in 1997 and as previously shown the proportion of possible recombinants increased slightly from 6.9% in 1997 to 10.5% in 2000 in Niger.⁶ Importantly, the three variants that we characterized have three different mosaic structures with many breakpoints, leading to viruses with even more complex mosaic patterns, because both parental viruses already had complex structures. The discovery of large numbers of recombinant viruses clearly implies that coinfection with divergent HIV-1 strains is not as rare as once thought. Indeed, dual infections with different subtypes have been reported in regions where multiple variants cocirculate,^{10,11} and two independent studies confirmed that superinfection with a virus from another clade is possible.^{12,13} Recombination introduces genetic and possibly also biological consequences that are far greater than those resulting from the steady accumulation of single mutations. Because natural infection does not protect against super-

FIG. 1. For the bootstrap plots, the SimPlot software performed bootscanning on neighbor-joining trees by using SEQBOOT, DNADIST (with the Kimura parameter method and a transition/transversion ratio of 2.0),⁹ NEIGHBOR and CONSENSE from the PHYLIP package for a 500-bp window moving along the alignment in increments of 10 bp. We evaluated 100 replicates for each phylogeny. The bootstrap values for the studied sequences were plotted at the midpoint of each window. (a), (c), and (e) show the bootscan plots of the 97NE-003, 00NE-036, and 00NE-095 strains, respectively, against the consensus (50% threshold) of the nonrecombinant subtype references (A–D, F–H, J, and K). (b), (d), and (f) show the bootscan plots of the 97NE-003, 00NE-036, and 00NE-095 strains, respectively, against the consensus (50% threshold) of the CRF02-AG and CRF06-cpx references. The new sequences were aligned with and compared with the following reference sequences: subtype A (92UG-UG037, 94SE-SE7523, and 94KE-Q23), subtype B (90US-WEAU160, 86US-JRFL, and 83FR-HXB2), subtype C (86ET-ETH2220, 96BW-0502, and 95IN-21068), subtype D (94UG-114, 83CD-NDK, and CD-Z226), subsubtype F1 (93BR-20, 93BE-VI850, and 93FI-FIN9363), subsubtype F2 (95CM-MP255 and CM-MP257), subtype G (93SE-SE6165, 93FI-HH8793, and 96DE-DRCBL), subtype H (90CF-CF056, BE.VI991, and BE.VI997), subtype J (93SE-SE92809 and 93SE-SE91733), subtype K (97CD-EQTBl1 and 96CM-MP535), CRF02-AG (IBNG, DJ263, and 98SE-MP1211), and CRF06-cpx (BFP90, 95ML-84, and 97SE-1078).

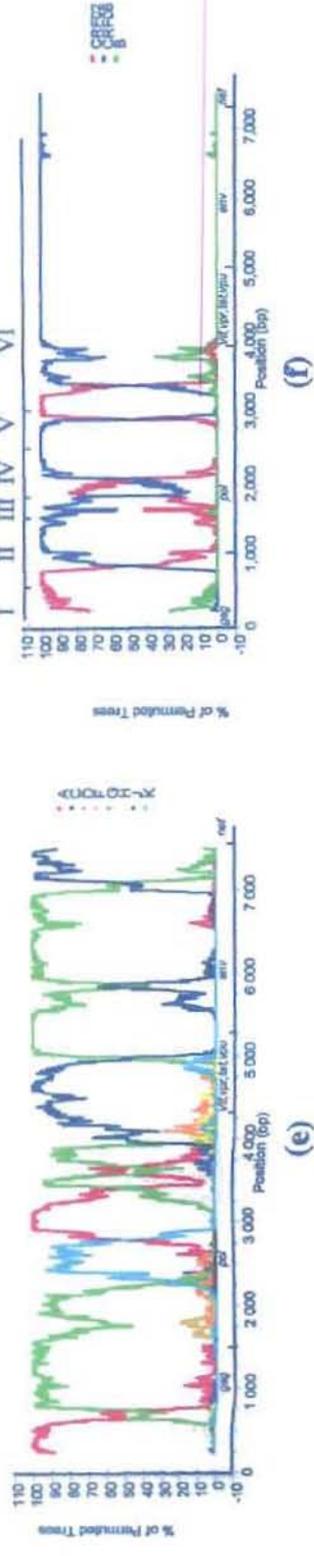
97NE-003



00NE-36



00NE-095



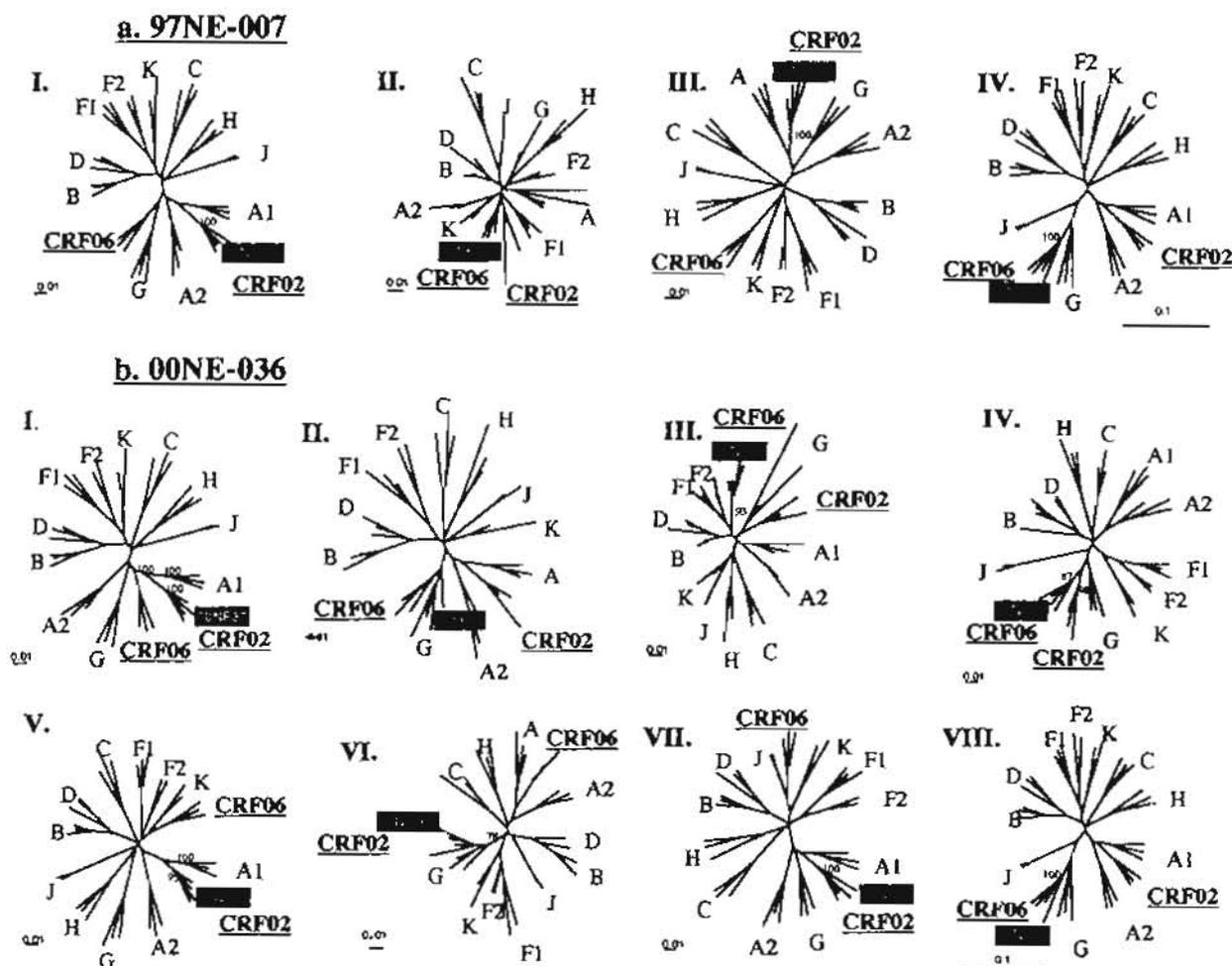


FIG. 2. Phylogenetic trees, confirming the different subtype/CRF designations identified by the bootstrap plots in Fig. 1b, d, and f for the three new strains. All bootstrap values were above 80% (100 replicates) at each of the internal branches defining a subtype. The same reference strains as described for Fig. 1 were used. Nucleotide sequences of the near full-length genomes were aligned using CLUSTAL W⁸ with minor manual adjustments, bearing in mind the protein sequences. Sites where there was a gap in any of the sequences, as well as areas of uncertain alignment, were excluded from all sequence comparisons. Phylogenetic trees were constructed by the neighbor-joining method and reliability of the branching orders, using the bootstrap approach, were implemented by CLUSTAL W. TreeView was used to draw trees for illustrations. Genetic distances were calculated by the Kimura two-parameter method, with a transition/transversion ratio of 2.⁹

infection with viruses from other clades and because differences related to efficiency of diagnostic assays and antiretroviral drugs exist among the various HIV-1 variants, ongoing monitoring of circulating HIV-1 strains in the context of vaccine development and treatment strategies remains necessary.

As suggested already by Wilbe *et al.*,¹⁴ the description of future recombinants should not remain restricted to pure subtypes. Especially in regions where CRFs predominate, these strains should also be included in the analysis in order to identify the most closely related parental forms and to reflect a reliable picture of the evolution of the epidemic.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was sponsored by grants from the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS, Projet Sidak)

SEQUENCE DATA

The new sequences have been deposited in the EMBL Data Library under the following accession numbers: AJ508595 (97NE-003), AJ508596 (00NE-95), and AJ508597 (00NE-36).

c. 00NE-095

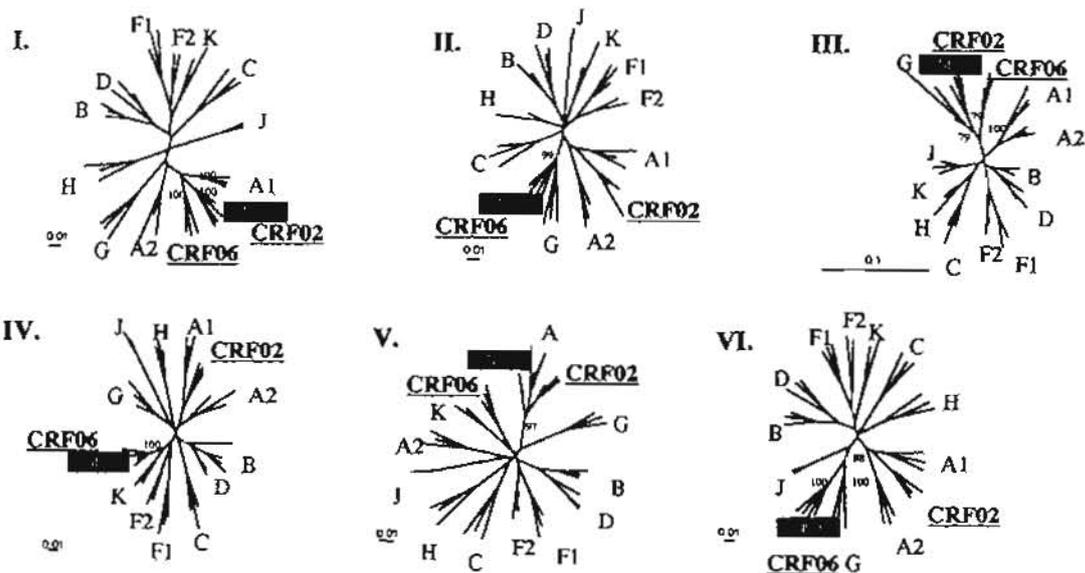
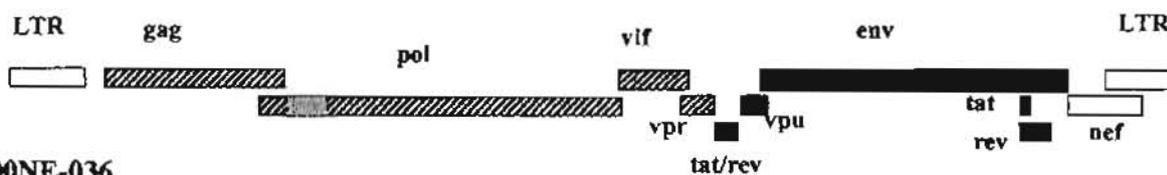
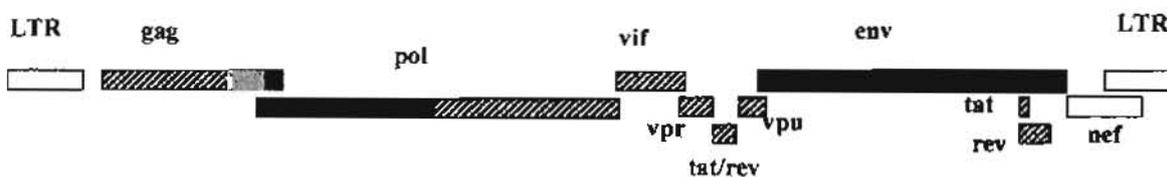


FIG. 2. (Continued)

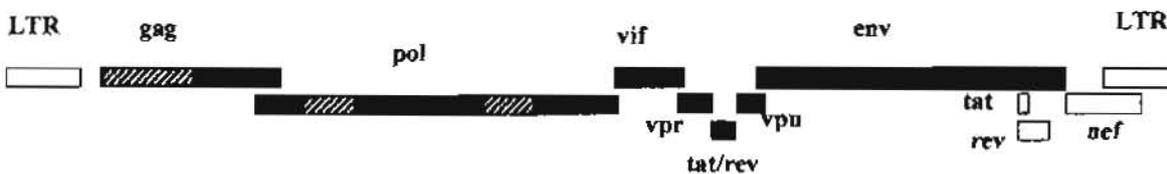
a. 97NE-003



b. 00NE-036



c. 00NE-095



▨ CRF02-AG

■ CRF06-cpx

□ Could not be classified with significant bootstrap values

FIG. 3. Schematic representation of the mosaic structures of the CRF02-AG/CRF06-cpx recombinant genomes.

REFERENCES

1. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, *et al.*: HIV-1 nomenclature proposal. In *Human Retroviruses and AIDS 1999: A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences*. (Kuiken CL, Foley B, Hahn B, Korber B, McCutchan F, Marx PA, Mellors JW, Mullins J, Sodroski J, and Wolinsky S, eds.). Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico, pp. 492-505.
2. McCutchan F: Understanding the genetic diversity of HIV. *AIDS* 2000;14(Suppl 3):S31-S44.
3. Peeters M and Sharp P: The genetic diversity of HIV-1: The moving target. *AIDS* 2000;14(Suppl. 3):S129-S140.
4. Montavon C, Bibollet-Ruche F, Robertson D, *et al.*: The identification of a complex A/G/IIJ recombinant HIV type 1 virus in various West African countries. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999;15:1707-1712.
5. Montavon C, Toure-Kane C, Nkengasong JN, *et al.*: CRF06-cpx: A new circulating recombinant form of HIV-1 in West Africa involving subtypes A, G, K, and J. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002;29:522-530.
6. Mamadou S, Montavon C, Ben A, *et al.*: Predominance of CRF02_AG and CRF06-cpx in Niger, West Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002;18:723-726.
7. Ouédraogo-Traoré R, Montavon C, Sapou T, *et al.*: CRF06-cpx plays a major role in the AIDS epidemic in Burkina Faso and represents 50% of infections in AIDS patients in Ouagadougou, the capital city. *AIDS* 2002 (in press).
8. Thompson J, Higgins D, and Gibson T: Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;22:4673-4680.
9. Kimura K: A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980;16:111-120.
10. Arntstein AW, VanCott TC, Mascola JR, Carr JK, Hegerich PA, Gaywee J, Sanders-Buell E, Robb ML, Dayhoff DE, and Thivichianler S: Dual infection with human immunodeficiency virus type 1 of distinct envelope subtypes in humans. *J Infect Dis* 1995;171:805-810.
11. Janini LM, Tanuri A, Schechter M, Peralta JM, Vicente AC, Dela Torre N, Pieniazek NJ, Luo CC, Ramos A, Soriano V, Schochetman G, Rayfield MA, and Pieniazek D: Horizontal and vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1 dual infections caused by viruses of subtypes B and C. *J Infect Dis* 1995;177:227-231.
12. Jost S, Bernard MC, Kaiser L, *et al.*: A patient with HIV-1 superinfection. *N Engl J Med* 2002;347:731-736.
13. Ramos A, Hu DJ, Nguyen L, *et al.*: Intersubtype human immunodeficiency virus type 1 superinfection following seroconversion to primary infection in two injection drug users. *J Virol* 2002;76:7444-7452.
14. Wilbe K, Casper C, Albert J, and Leitner T: Identification of two CRF11-cpx genomes and two preliminary representatives of a new circulating recombinant form (CRF13-cpx) of HIV type 1 in Cameroon. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002;18:849-856.

Address reprint requests to:

Martine Peeters
UR36, Laboratoire Retrovirus, IRD
911 Avenue Agropolis
BP 64501
34394 Montpellier cedex 5, France

E-mail: martine.peeters@mpl.ird.fr

**SERO-EPIDEMIOLOGIE ET CARACTERISATION
MOLECULAIRE DU VIH-1 GROUPE O**

I-CONTEXTE

La nécessité d'étudier la distribution géographique du VIH-1 du groupe O s'était imposée peu de temps après la description des premières souches, devant les conséquences (notamment pour la transfusion sanguine) de la mise en défaut de certains tests sérologiques pour la détection de ces variants divergents.

Le laboratoire Rétrovirus de Montpellier, érigé en Centre Collaborateur OMS pour le VIH-1 groupe O, et le laboratoire de Bactériologie-Virologie du CHU Le Dantec devenu Centre Collaborateur ONUSIDA, avaient entrepris une telle étude dans plusieurs d'Afrique Subsaharienne, associant des intervenants locaux.

II-MATERIEL ET METHODES

L'étude a porté sur 14 682 sérums de différents profils VIH, provenant de plusieurs catégories de personnes et de 12 pays : Burkina Faso (568), Burundi (686), Cameroun (1143), Congo (702), Gabon (5701), Mali (1016), **Niger (2619)**, Nigéria (2083), Sénégal (2432), Tchad (619), Togo (1113) et Zambie (1000).

Différents tests ont été utilisés : un ELISA à base de peptides V3 des souches ANT70 et MVP5180, un LIA incluant les mêmes peptides, un Western Blot ANT70 « maison », une RT-PCR avec des amorces universelles et des amorces spécifiques du groupe O.

III-RESULTATS

Nous avons dépisté 19 cas d'infection à VIH-1 groupe O, au niveau de 7 pays. Ils étaient tous déjà VIH positifs et provenaient de femmes enceintes, de donneurs de sang, de tuberculeux et de professionnelles du sexe.

Ainsi, la séoprévalence des variants O parmi les VIH positifs était de : 2,1% au Cameroun, 1,1% au Nigéria, 0,9% au Gabon, **0,3% au Niger**, 0,16% au Tchad, 0,14% au Togo, 0,07% au Sénégal. Elle décroît donc au fur et à mesure que l'on s'éloigne du Cameroun considéré comme l'épicentre de la diffusion de ces virus.

Par ailleurs, 46 autres sérums présentait une sérologie « groupe O » indéterminée. Tous étaient aussi VIH positifs, sauf un VIH indéterminé du Congo et deux VIH négatifs du Burundi. La RT-PCR spécifique a permis de confirmer deux cas d'infection O : l'un au Cameroun, l'autre en Zambie qui devenait le huitième pays où cette enquête a mis en évidence la circulation des virus du groupe O.

Geographical distribution of HIV-1 group O viruses in Africa

Martine Peeters, Aissatou Gueye*, Souleymane Mboup*,
 Frederic Bibollet-Ruche, Euloge Ekaza, Claire Mulanga,
 Rasmata Ouedrago[†], Regine Gandji[‡], Pierre Mpele[§],
 Germaine Dibanga^{||}, Brahim Koumare[¶], Mamadou Saidou^{**},
 Eka Esu-Williams^{††}, Jean-Piere Lombart^{‡‡}, Wanta Badombena^{§§},
 Nkandu Luo^{|||}, Marleen Vanden Haesevelde^{¶¶} and Eric Delaporte

Objective: To determine to what extent HIV-1 group O strains are present in different African countries.

Materials and methods: A total of 14 682 samples of sera from a range of patients from 12 different African countries were tested. All the sera were tested with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a combination of V3 peptides from ANT-70 and MVP-5180. Samples reactive in ELISA were retested in a line immunoassay (LIA-O). Samples reactive in ELISA were also retested with an in-house Western blot to determine the presence of antibodies to gp120 of HIV-1 ANT-70. Polymerase chain reaction was performed on HIV-1 group O and group O indeterminate sera.

Results: Of all the sera samples tested, only 19 sera had antibodies to group O V3 peptides exclusively and 46 were indeterminate for group O infection in LIA-O. The highest prevalence of HIV-1 group O infection among HIV-positive sera was observed in Cameroon (2.1%) and neighbouring countries, 1.1% in Nigeria and 0.9% in Gabon. The lowest rates were seen in west Africa: 0.07% in Senegal, 0.14% in Togo, 0.16% in Chad and 0.3% in Niger. Group O sera were observed in almost all the population categories tested. The ANT-70 V3 peptide in LIA-O was reactive with all of the sera considered to be HIV-1 group O antibody positive by LIA, versus 78.9% for the MVP-5180 peptide. Thirteen out of 19 group O samples of sera were tested in PCR. Eight samples were identified as group O by specific group O *pol* and/or V3 primers; in the remaining five samples no HIV RNA could be detected. Of the indeterminate sera samples, two were identified as group O.

Conclusion: In eight of the 12 countries tested, antibodies to group O viruses were identified. Numbers of HIV-1 group O viruses are low. Their presence is not restricted to Cameroon and neighbouring countries but can also be found in west and south-east Africa.

AIDS 1997, 11:493-498

Keywords: HIV-1 group O, Africa, serotyping

From the Laboratoire Retrovirus, ORSTOM, Montpellier, France, *Hôpital Le Dantec, Dakar, Senegal, †Hôpital Yalgado Ouedrago, Ouagadougou, Burkina Faso, ‡Hôpital Laquintinie, Douala, Cameroun, the §National AIDS Control Programmes, Brazzaville, Congo and ||Libreville, Gabon, ¶Institut National de Santé Publique, Bamako, Mali, **Centre Hospitalier Universitaire, Niamey, Niger, ††University of Calabar, Nigeria, ‡‡Centre de Transfusion Sanguine, Ndjamena, Chad, §§Service de Santé des Forces Armées Togolaises, Lomé, Togo, |||University of Zambia, Lusaka, Zambia and ¶¶Innogenetics NV, Ghent, Belgium.

Sponsorship: Projet SIDA is supported by the Agence National pour les Recherches contre le SIDA and the French Ministry for Cooperation by grant 95017 from the Global AIDS Programme from the World Health Organization.

Requests for reprints to: Martine Peeters, Laboratoire Retrovirus, ORSTOM, 944 Boulevard Agropolis, 34032 Montpellier Cedex 1, France.

Date of receipt: 23 September 1996; revised: 5 December 1996; accepted: 10 December 1996.

Introduction

HIV-1 displays an unusually high degree of genetic variability *in vivo*. Analysis of HIV-1 genes of virus strains from different geographical locales has revealed that HIV-1 can be divided into two distinctive groups, M (major) and O (outlier) [1]. HIV-1 group M isolates can be further subdivided into at least 10 distinct genetic subtypes (A-J) [2-5].

The first HIV-1 group O viruses to be described were the ANT-70 and MVP-5180 strains, both isolated from Cameroonians. These isolates had only 50% homology with the other HIV-1 isolates in the *env* gene [6,7]. Additional HIV-1 group O variants have been described and the majority of the strains have been obtained from Cameroon or from Cameroonians living in Europe [8,9]. Group O virus was identified in Spain in an individual who often travelled to Equatorial Guinea and Cameroon [10]. Recently, group O infection was diagnosed in the US [11]. Sporadic cases of group O infection have been documented in other African countries like Gabon, Nigeria, Equatorial Guinea and Kenya, and in Benin a dual HIV-1 group M and O infection has been described. [12-16]

Analysis of group O viruses shows that these viruses are genetically very diverse [8]. These HIV viruses present a public health challenge because several of them escape detection by certain conventional screening tests and can give indeterminate Western blot patterns [17-19]. To diagnose HIV-1 group O infection different serological approaches have been used. Some researchers use a competitive immunoblot or a negative result in HIV-1 competitive assays [20-21]. Studies among HIV-infected individuals from different African countries, using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the V3 peptide from ANT-70 with confirmation by a specific ANT-70 Western blot, indicated that HIV-1 group O infection is present in Cameroon and Gabon [12]. Sequence data on a limited number of samples confirmed that this strategy can lead to the identification of HIV-1 viruses from group O [22]

Up until now little has been known about the spread of HIV-1 group O viruses in Africa. It is important to monitor these viruses in order to adapt HIV-testing strategies for blood screening and serodiagnosis if required.

Materials and methods

Populations studied

Sera from different population categories of 12 African countries were studied: Burkina Faso, Burundi,

Cameroon, Congo, Gabon, Mali, Niger, Nigeria, Senegal, Chad, Togo and Zambia.

Samples were collected from AIDS patients, tuberculosis patients, sexually transmitted disease (STD) patients, prostitutes, blood donors and pregnant women. Table 1 summarizes the population categories tested and the HIV status of the samples in the different countries. Data for Nigeria, Senegal and Togo have been partially published earlier [23]. In total we tested 14 682 samples of sera: 1427 from blood donors (260 HIV-positive, 150 HIV-indeterminate, 1017 negatives); 2489 from pregnant women (522 HIV-positive, 87 HIV-indeterminate, 1880 negatives); 7406 from infectious diseases and tuberculosis patients (5007 HIV-positive, 272 HIV-indeterminate, 2127 negatives); 961 from STD patients (187 HIV-positive, 30 HIV-indeterminate, 744 negatives); and 2399 from prostitutes (1102 HIV-positive, 49 HIV-indeterminate, 1248 negatives).

Among the 14 682 sera samples, 7016 were HIV-negative and 550 were HIV-indeterminate, i.e. those samples in which there was the presence of antibodies to Gag and/or Pol proteins only, without reaction to Env proteins on HIV-1 Western blot or line immunoassay (LIA) HIV-1/2. A total of 7078 were HIV-positive: 2781 HIV-1, 380 HIV-2, 376 HIV-1 and -2 and 3541 were defined as HIV-positive by a positive reaction in two different HIV-1 and -2 screening assays.

Serology

All the sera were tested for group O antibodies by an ELISA using a combination of V3 peptides from ANT-70 and MVP-5180 (Immogenetics, Antwerp, Belgium). Sera reactive by ELISA were retested in an LIA, in which biotinylated V3 peptides from different group O and M HIV-1 viruses (consensus HIV-1 group M: M-Mal; O-ANT-70; O-V1686, which is a Gabonese HIV-1 group O isolate [22], and O-MVP-5180) were applied as a streptavidin complex in parallel lines on nylon strips (Immogenetics). Samples reactive in ELISA were also retested on an in-house Western blot for the presence of antibodies to gp120 of HIV-1 ANT-70 as previously described [24]. Sera were considered positive for HIV-1 group O antibodies if they reacted on LIA exclusively with group O peptides whether or not there was reaction on the ANT-70 Western blot. Samples reactive with group O and M peptides with or without reaction to gp120 on ANT-70 Western blot were considered as indeterminate for HIV group O antibodies and were further analysed by polymerase chain reaction (PCR). The testing algorithm is summarized in Fig. 1.

PCR

Viral RNA was extracted from 50 µl of plasma by the extraction method of Chomezynski and Sacchi [25].

Table 1. Different population groups and their HIV status in the 12 African countries studied.

	HIV-1	HIV-1 HIV-2 and -2	HIV pos	HIV ind	HIV neg	Total
Burkina Faso (n=568)						
AIDS patients, TB pregnant women	206	49	143	36	134	568
Burundi (n=686)						
Blood donors			13	1	129	143
TB patients			84	10	249	343
Cameroon (n=1143)						
Blood donors			118	18	308	414
Pregnant women	21	1	18	23	134	197
Infectious diseases			174	3	325	502
Chad (n=619)						
Infectious diseases, TB			619			619
Congo (n=702)						
Blood donors	4			3	164	171
Pregnant women	9			4	106	119
Infectious diseases	275			26	111	412
Gabon (n=701)						
Pregnant women	90	5	1	40	375	511
Infectious diseases	36	2	1	2	26	67
TB patients	76	1	1	21	24	123
Mali (n=1016)						
Infectious disease						
TB	244	2	44	445		106
Prostitutes	62	7	12			94
Niger (n=2619)						
Blood donors	48		15	62	128	216
Pregnant women	4			36		36
Infectious diseases	598		165	233	111	27
STD patients	29		11	22	12	402
Prostitutes	187	2	46	1	22	206
Nigeria (n=2083)						
Pregnant women				11	20	1011
Infectious diseases				14	11	120
TB patients				8	12	220
STD patients				30	18	222
Prostitutes				120	26	240
Senegal (n=2432)						
Pregnant women	9	15	2			218
Infectious diseases	531		22	40	182	775
TB patients	22					22
STD patients	16	1				17
Prostitutes	314	344	7	1	708	1374
Togo (n=1113)						
Infectious diseases, TB				670		443
Zambia (n=1000)						
Pregnant women				300		300
Infectious diseases				242		160
TB patients				100		100
STD patients				78		120

pos, Positive; ind, indeterminate; neg, negative; TB, tuberculosis; STD, sexually transmitted disease

Briefly, virus is lysed by guanidium thiocyanate, followed by a phenol/chloroform-isoamyl alcohol extraction and RNA is precipitated by isopropanol. Extracted RNA is resuspended in 5 µl sterile water.

Reverse transcription was performed on 5 µl of extracted RNA in a final volume of 20 µl containing 10 pmol of each reverse primer, 0.4 mmol of each dNTP and 5 units of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (RT) (Promega, France). The cDNA product was amplified by nested PCR using primers in the *pol*

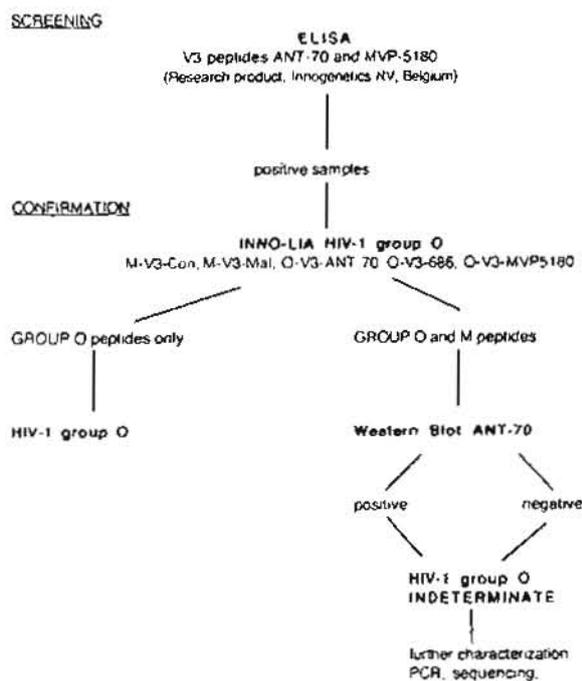


Fig. 1. Serological testing algorithm for the detection of HIV-1 group O infection. ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; LIA, line immunoassay.

region as previously described. The outer primers were common for group O and M viruses and one of the inner primers was replaced by a specific group O primer to identify an HIV-1 group O infection with a 100% sensitivity and specificity [26,27]. For some serum samples PCR was carried out with primers specific for the V3 region of group O viruses. We used V70-1 (5' TTGTACACATGGCATTAGGCCAACA GTAAGT 3') and V70-4 (5' TGGATCCTACAAT AAAAGAATTCTCCAGACA 3') as outer primers and V70-2 (5' TGAATTCTAATATTGAAT GCGA CACTCTCT 3') and V70-5 (5' GTTCTCCATAT ATCTTTTCATATCTCCCTA 3') as inner primers. PCR was performed in a final volume of 50 µl containing 0.2 mmol of each dNTP, 20 pmol primer, 2.5 U Taq DNA polymerase (Promega) and 5 µl of the cDNA.

PCR conditions were as follows: 35 cycles were performed, 20 sec at 94°C, 30 sec at 50°C and 1 min at 72°C with an initial denaturation of 2 min at 94°C and a final extension of 5 min at 72°C. The second PCR round was performed on 2 µl of the amplified product from the first round and the cycling conditions were identical, with the exception of the group O *pol* primers where the optimal annealing temperature was 56°C.

Samples were considered as positive for HIV-1 group O if they reacted with the specific group O *pol* and/or *env* primers.

Results

Prevalence of HIV-1 group O antibodies

Table 2 shows for the different countries the number and percentage of sera positive for HIV-1 group O antibodies. All these sera were positive in the ANT-70/MVP-5180 mixed ELISA and reacted specifically with V3 peptides from group O on the LIA. Fifteen of these 19 group O sera also reacted with the gp120 of ANT-70 on Western blot. Based on these strict serological criteria, group O sera were present in seven of the 12 countries tested: Cameroon, Gabon, Niger, Nigeria, Senegal, Chad and Togo. Of the 19 HIV group O sera, all were initially characterized as HIV-positive, 18 were HIV-1 and one was HIV-1 and -2-positive. None of the HIV-2-positive sera were reactive with group O peptides. The highest numbers of HIV-1 group O sera were observed in Cameroon (2.1%) and the neighbouring countries Nigeria (1.1%) and Gabon (0.9%) whereas the lowest values were observed in the West African countries Senegal (0.07%), Togo (0.14%), Chad (0.16%) and Niger (0.3%). Group O sera were identified in pregnant women, AIDS and tuberculosis patients, blood donors and prostitutes.

Table 2. Number of HIV-1 group O and group O indeterminate sera among HIV-positive sera in the different countries.

Country	HIV group O		HIV group O indeterminate	
	n*/N [†]	%	n [‡] /N [†]	%
Burkina Faso	0/398	0.0	6/398	1.5
Burundi	0/97	0.0	0/97	0.0 [§]
Cameroon	7/332	2.1	2/332	0.6
Chad	1/619	0.16	17/619	2.7
Congo	0/288	0.0	2/288	0.7 [¶]
Gabon	2/213	0.9	0/213	0.0
Mali	0/816	0.0	4/816	0.5
Niger	5/1459	0.3	1/1459	0.07
Nigeria	2/183	1.1	0/183	0.0
Senegal	1/1283	0.07	1/1283	0.07
Togo	1/670	0.14	3/670	0.44
Zambia	0/720	0.0	7/720	0.97

*No. of sera reactive with group O only or [†]group O- and M-V3 peptides in LIA-O. [‡]Total number of HIV antibody-positive sera tested. [§]Two HIV-O indeterminate sera were observed among HIV-negative sera in Burundi. [¶]One HIV-O indeterminate serum sample was observed in HIV-indeterminate serum in Congo.

In total, 46 samples of sera were indeterminate for the presence of group O antibodies, i.e. the sera reacted simultaneously with group O V3 peptides and the V3 consensus of group M- or V3-Mal. The proportion of group O-indeterminate sera was relatively high compared with the number of sera that were confirmed group O. The majority of these 46 sera were HIV-positive, but one was indeterminate for HIV antibodies and two were negative. Group O-indeterminate sera were observed in nine of the 12 countries tested. The overall prevalence of HIV-O-indeterminate samples

was 0.69% of the HIV-positive sera and ranged from 0% to 2.6% in the different countries.

Antibody reactions to the different group O and M peptides and proteins

Table 3 summarizes the antibody reactions to the different group O peptides. On LIA-O, all of the 19 (100%) group O sera reacted with the ANT-70 peptide, 18 out of 19 (94.7%) with the V1686 peptide and 15 out of 19 (78.9%) with the MVP-5180 peptide. For the HIV-O indeterminate sera, the majority (82.9%) reacted with the ANT-70 peptide but only 36.2% and 48.9% reacted with the V1686 and MVP-5180 peptide respectively. Some of the indeterminate sera reacted only with the MVP-5180 peptide in contrast to the sera that were confirmed group O. In Mali and Congo, we observed samples of sera reacting strongly with the MVP-5180 peptide and the M-V3 consensus without antibodies to gp120 on ANT-70 Western blot.

Table 3. Reactivity of HIV-1 group O and group O-indeterminate sera with the different group M and O peptides on LIA and with ANT-70 gp120 on Western blot.

Peptides	HIV-1 group O		HIV-1 group O indeterminate	
	n*/N [†]	%	n*/N [†]	%
M-V3-Con	0/19	0	40/46	86.9
M-V3-Mal	0/19	0	37/46	80.4
O-V3-ANT-70	19/19	100	38/46	82.6
O-V3-686	18/19	94.7	16/46	34.7
O-V3-MVP-5180	15/19	78.9	22/46	47.8
O-Western blot ANT-70	15/19	78.9	14/46	30.4

*No. of sera reactive. [†]No. of sera tested

PCR

Only minute volumes of serum were available for the majority of samples serologically considered to be HIV-1 group O or group O-indeterminate, and therefore not all of them were tested by PCR. In addition, storage conditions (several freeze-thaw cycles and storage at -20°C, which causes deterioration of RNA) were not optimal to perform RT-PCR. Among the 19 group O sera, 13 were tested by PCR with the universal group O/M primers to confirm the presence of RNA in the sample and with the specific group O *pol* primers for confirmation of group O. Five were reactive with the universal *pol* primers and five were identified as group O with the specific group O *pol* primers, whereas in eight no viral RNA could be detected by PCR with the universal *pol* primers. In addition, PCR was carried out with the specific group O V3 primers on 10 samples from which nine had been tested also with the *pol* primers. Only three samples were reactive with the V3 group O primers, two of these three samples were initially negative for the universal O/M *pol* primers and one was not tested with the *pol* primers.

Of 38 of the 46 sera identified as group O-indeterminate by serology, RT-PCR was performed with the

universal *pol* primers to confirm the presence of RNA and with specific group O *pol* primers to confirm group O infection. Twenty of the 38 samples were reactive with the universal *pol* primers and only two of them were identified as group O with the specific group O *pol* primers. The 18 remaining samples were negative by *pol* PCR. Of the two samples reactive with group O *pol* primers one was from Zambia and one was from Cameroon. All of the nine group O-indeterminate samples (five were positive and four were negative with universal *pol* primers) tested with the specific V3 primers were negative with this primers (Table 4). Overall, in the group O and group O-indeterminate sera together, RNA could be detected in 28 (54.9%) out of 51 samples tested.

Table 4. Reactivity of group O and group O indeterminate sera by PCR with different primers sets.

	Group O No. reactive / no. tested	Group O indeterminate No. reactive / no. tested
Universal <i>pol</i> primers	5/13*	20/38*
Group O <i>pol</i> primers	5/5	2/20
Group O V3 primers	3/10	0/9

*Sera were first tested with the universal *pol* primers and those reactive were retested with the specific group O *pol* primer. †One out of three sera was negative with the universal and specific *pol* primers; one out of three was reactive with the universal *pol* but not with group O *pol* primer; one out of three was not tested with *pol* primers.

Antibody reaction to gp120 of ANT-70 on Western blot

Ten samples were identified as group O by PCR, of which two were indeterminate by group O serology because they reacted simultaneously with group O and group M V3 peptides. Nine of these 10 samples reacted with the gp120 of ANT-70 on Western blot and one was negative. Eighteen samples were identified as group M by PCR and among them five were clearly reactive on the ANT-70 gp120, three showed a weak reaction and 10 were negative. These data indicate that the majority of HIV-1 group O sera are reactive with gp120 of ANT-70 although some sera remain negative. About 50% (eight out of 18) of the group M sera that cross-reacted with group O V3 peptides on LIA were also reactive with gp120 of ANT-70 on Western blot. These data show that HIV-1 group O Western blot is not sensitive enough and is also not specific enough.

Discussion

This study on more than 14 600 sera from different population groups and in 12 African countries showed that the seroprevalence of HIV-1 group O viruses is rather low, ranging from absent to 2.1% of all the HIV-positive sera tested. HIV-1 group O infection was

observed in eight of the 12 countries included in the study, however. The highest percentage of group O sera among HIV-positive samples was observed in Cameroon (2.1%), followed by Nigeria (1.1%) and Gabon (0.9%), whilst the lowest percentages were seen in west Africa. Our data show that group O infection is not limited to Cameroon and its neighbouring countries but is also present in west African countries such as Senegal, Togo and Niger and even in the south-east African country Zambia. All HIV-1 group O sera were detected among samples which were initially identified as being HIV-positive. The ANT-70/MVP-5180 V3 ELISA had good specificity because only three out of 7016 HIV antibody-negative sera were reactive with group O peptides on LIA-O and all remained group O indeterminate in group O LIA.

All group O sera reacted with the ANT-70 peptide with or without simultaneous reaction to the other group O peptides VI686 or MVP-5180, none reacted only to the MVP-5180 or VI686 peptide. Compared with HIV-1 group O sera, a relatively high number of group O-indeterminate sera was observed and this was the case in almost all the countries studied. The majority of the group O-indeterminate sera were HIV-positive with the exception of two sera which were HIV-negative and one which was HIV-indeterminate.

Our data indicate that the ANT-70 V3 peptide detects more group O sera than the MVP-5180 and the VI686 peptides. The V3 sequence of the ANT-70 virus strain is close to the consensus sequence of HIV-1 group O viruses described [6-8] and sequenced in our laboratory (unpublished results). Further examination is needed, however, to discover whether the peptides that we used for screening and confirmation of HIV-1 group O infection are the most sensitive for detecting and diagnosing the diverse range of group O viruses. Preliminary results on the performance of the ANT-70 V3 peptide on group O sera confirmed by sequence data in our laboratory indicate that this peptide detects all group O infections. The significance of a strong serological reaction simultaneously with the MVP-5180 peptide and the M-V3 consensus as observed in one serum from Congo and one from Mali remains to be elucidated.

Eight out of 19 sera, reacting exclusively with group O V3 peptides and in which RNA could be detected by RT-PCR, were all confirmed by PCR as group O by either specific group O *pol* or V3 primers. Two out of 20 (10%) of the serologically group O-indeterminate sera were identified as group O by PCR. These data indicate that the majority of the individuals whose sera react simultaneously with group O- and M-V3 peptides are infected with an HIV-1 group M virus. Another possibility is the development of dual infection with an HIV-1 group M and group O virus whereby HIV group O expression may be suppressed at certain

stages of the infection, although this can only explain a minority of the group O indeterminate sera on LIA.

The value of a reactivity with the gp120 of ANT-70 on Western blot seems very limited and remains to be determined. The Western blot was not sufficiently sensitive as one out of the 10 PCR-confirmed group O sera remained negative on gp120. Almost half (eight out of 18) of group O indeterminate sera, identified as group M by PCR, were also reactive with gp120 indicating that ANT-70 Western blot was also not specific enough. Our strategy, based on the use of V3 peptides from ANT-70 and MVP-5180, detects the majority of the group O sera. It could be that the criteria that we used were too strict since two sera were classified as group O-indeterminate. If less strict criteria are used, however, a large number of sera would be classified as group O and would overestimate the prevalence of group O infection. Further studies on 'gold standard' sera, i.e. sera from individuals proven to be confirmed with group O viruses based on sequence and phylogenetic analysis, are necessary to evaluate the intrinsic sensitivity of this and other strategies to diagnose group O infection.

Unfortunately, it was not possible to obtain demographic data for the majority of group O sera from West Africa, such as a history of travelling to Cameroon or neighbouring countries, or sexual contacts with people from these regions. Only from the group O sample from Senegal was it possible to obtain more epidemiological information. The serum was from a Senegalese woman who never left the country, but her husband had worked for several years in Cameroon and died from AIDS a few years ago.

In conclusion, group O viruses are actually present in very low numbers in Africa but further prospective studies are necessary to monitor the true prevalence of these viruses in Cameroon, its neighbouring countries and West Africa, especially to determine if the prevalence of these viruses increases. Future studies should also analyse the risk factors associated with group O infection.

Acknowledgements

We thank F. Liegeois and D. Patrel for technical assistance and G. Vercauteren for critical reading of the manuscript.

References

1. Charneau P, Borman A, Quillent C, et al.: Isolation and envelope sequence of a highly divergent HIV-1 isolate: definition of a new HIV-1 group. *Virology* 1994, 205:247-253.
2. Louwagie J, McCutchan F, Peeters M, et al.: Phylogenetic analysis

3. Janssens W, Heyndrickx L, Franssen K, et al.: Genetic and phylogenetic analysis of env subtypes G and H in Africa. *AIDS Res Hum Retrovirus* 1994, 10:877-879.
4. Kostrikis L, Bagdades E, Cao Y, Zhang L, Dimitriou D, Ho D.: Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 strains from patients in Cyprus: identification of a new subtype designated I. *J Virol* 1995, 69:6122-6130.
5. Meyers C, Korber B, Hahn B, et al. (Eds): *Human Retroviruses and AIDS 1995: A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences*. Los Alamos: Los Alamos National Laboratory; 1995.
6. Vanden Haesevelde M, Decourt JL, De Leys RJ, et al.: Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human virus isolate. *J Virol* 1994, 68:1586-1596.
7. Guntler L, Hauser PH, Eberle J, et al.: A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J Virol* 1994, 68:1581-1585.
8. Loussert-Ajaka I, Chaix ML, Korber B, et al.: Variability of human immunodeficiency virus type 1 group O strains isolated from Cameroonian patients living in France. *J Virol* 1995, 69:5640-5649.
9. Hampl H, Sawitzky D, Stöffler-Merlicke M, et al.: First case of HIV-1 subtype O infection in Germany [letter]. *Infection* 1995, 23:369-370.
10. Soriano V, Gutierrez M, Garcia-Lerma G, et al.: First case of group O infection in Spain [letter]. *Vox Sang* 1996, 71:66.
11. Centers for Disease Control and Prevention: Identification of HIV-1 group O infection, Los Angeles County, California, 1996. *MMWR* 1996, 45:561-564.
12. Nkengasong JN, Peeters M, vanden Haesevelde M, et al.: Antigenic evidence of the presence of the aberrant HIV-1_{ANT-70} virus in Cameroon and Gabon. *AIDS* 1993, 7:1536-1538.
13. Mulanga Kabeya C, Esu-Williams E, Enu E, Peeters M, Delaporte E: Evidence for HIV-1 group O infection in Nigeria [letter]. *Lancet* 1995, 346:308.
14. Hunt JC, Golden AM, Vallan A, et al.: Molecular and serologic characterization of four HIV-1 group O sera from Equatorial Guinea. *AIDS Res Hum Retrovirus* 1995, 11 (suppl 1):S144.
15. Songok EM, Libondo DK, Rotich MC, Oogo SA, Tukes PM: Surveillance for HIV-1 subtypes O and M in Kenya [letter]. *Lancet* 1996, 347:1700.
16. Heyndrickx L, Alary M, Janssens W, Davo N, van der Groen G.: HIV-1 group O and group M dual infection in Benin [letter]. *Lancet* 1996, 347:902-903.
17. Loussert-Ajaka I, Ly T-D, Chaix ML, et al.: HIV-1/HIV-2 seronegativity in HIV-1 subtype O infected patients. *Lancet* 1994, 343:1393-1394.
18. Schable C, Zekeng L, Pau C-P, et al.: Sensitivity of United States HIV antibody tests for detection of HIV-1 group O infections. *Lancet* 1994, 344:1333-1334.
19. Simon F, Ly TD, Baillou-Beaufils A, et al.: Sensitivity of screening kits for anti-HIV-1 subtype O antibodies. *AIDS* 1994, 8:1628-1629.
20. Zekeng L, Guntler L, Afaneze A, et al.: Prevalence of HIV-1 subtype O infection in Cameroon: preliminary results. *AIDS* 1994, 8:1626-1628.
21. Guntler L: Difficulties and strategies of HIV diagnosis. *Lancet* 1996, 348:176-179.
22. Janssens W, Nkengasong JN, Heyndrickx L, et al.: Further evidence of the presence of genetically aberrant HIV-1 strains in Cameroon and Gabon. *AIDS* 1994, 8:1012-1013.
23. Peeters M, Gaye A, Mboup S, et al.: Presence of HIV-1 group O infection in West Africa. *AIDS* 1996, 10:343-344.
24. Peeters M, Nkengasong J, Willems B, et al.: Antibodies to V3 loop peptides derived from chimpanzee lentiviruses and the divergent HIV-1_{ANT-70} isolate in human sera from different geographic regions. *AIDS* 1994, 8:1657-1661.
25. Chomczynski P, Sacchi N: Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987, 162:156-159.
26. Franssen K, Zhong P, De Beenhouwer H, et al.: Design and evaluation of new, highly sensitive and specific primers for polymerase chain reaction detection of HIV-1 infected primary lymphocytes. *Mol Cell Probes* 1994, 8:317-322.
27. Janssens W, Franssen K, Loussert-Ajaka I, et al.: Diagnosis of HIV-1 group O infection by polymerase chain reaction. *Lancet* 1995, 346:451-452.

Publication N°5

“Molecular characterization of the envelope transmembrane glycoprotein of 13 new human immunodeficiency virus type 1 group O strains from six different african countries”

(AIDS Res Hum Retroviruses, 1998; 14(14): 1281-1285)

Ce second travail sur les virus du groupe O a porté sur l'étude de leur variabilité au niveau d'une partie du gène *env* incluant une région immunodominante de la glycoprotéine transmembranaire gp41 qui joue un rôle important dans l'identification des anticorps anti-VIH (90).

La caractérisation moléculaire a été possible pour 13 souches VIH-1 groupe O, dont une des cinq dépistées au Niger (95NE-772P94). Il n'a pas été possible d'étudier les autres souches de ce pays : mauvaise conservation des sérums et impossibilité de retrouver les patients.

Une nested-PCR a été effectuée à partir de l'ADN extrait des PBMC pour les patients retrouvés, ou à partir de l'ADNc issu de la rétro-transcription de l'ARN encore intact extrait de certains sérums initiaux. Dans les deux cas, les amorces universelles 41-1/41-4 ont servi au premier round et les amorces spécifiques 41-6/41-7 au second. Les fragments obtenus ont été purifiés et séquencés comme précédemment.

L'arbre phylogénétique obtenu à partir d'un alignement sur 301 bp confirme l'appartenance au groupe O et montre surtout une grande divergence des souches, même au sein d'un pays donné (Cameroun).

L'alignement des acides aminés révèle cependant peu de différences au niveau de la région immunodominante entre les souches étudiées. Ces différences sont par contre assez importantes entre les souches O et M (sous-type B), ce qui pourrait expliquer la moindre sensibilité de certains tests sérologiques pour dépister les infections à virus du groupe O.

Ce travail a donc fourni 13 séquences env de VIH-1 groupe O, dont une pour le Niger qui est d'ailleurs la toute première séquence VIH provenant de ce pays. Elle est référencée dans la base de données EMBL, sous le numéro d'accèsion Y09767.

Short Communication

Molecular Characterization of the Envelope Transmembrane Glycoprotein of 13 New Human Immunodeficiency Virus Type 1 Group O Strains from Six Different African Countries

FRÉDÉRIC BIBOLLET-RUCHE,¹ MARTINE PEETERS,¹ SOULEYMANE MBOUP,² EULOGE EKAZA,¹
REGINE GANDJI,³ JUDITH TORIMIRO,⁴ EITEL NGOLE MPOUDI,⁴ JACQUES AMBLARD,⁵
GERMAINE DIBANGA,⁵ MAMADOU SAIDOU,⁶ EKA ESU-WILLIAMS,⁷
MARLEEN VANDEN HAESVELDE,⁸ ERIC SAMAN,⁸ and ERIC DELAPORTE¹

GENETIC ANALYSIS OF MANY HIV-1 isolates collected from different parts of the world revealed that they can be divided into two major phylogenetic groups, group M and group O. HIV-1 group M isolates can be further subdivided into at least 10 different genetic subtypes and group M infections predominate worldwide.¹ The first HIV-1 group O viruses to be described were the ANT-70 and MVP-5180 strains, both isolated from Cameroonians.^{2,3} HIV-1 group O seems to be endemic in West Central Africa, especially Cameroon, where the frequency of infection is estimated to be 2-5% of HIV-1-infected individuals, but sporadic cases have been documented in West, East, and southern Africa.^{4,5} HIV-1 group O-infected individuals have also been identified in Europe (Belgium, France, Germany, Spain) and in the United States.⁶⁻⁹ With the exception of a French woman,¹⁰ all reported group O-infected individuals originate from or have a connection to West Central Africa. In addition, the first case of AIDS documented in Europe was a Norwegian sailor infected with a group O virus.¹¹ Infections with HIV-1 isolates from group O present a public health problem because antibodies against them might not be detected. Indeed, several reports indicated that selected commercial assays failed to detect or only weakly detected group O sera.^{12,13} Since the publication of these observations, screening tests have been adapted to detect antibodies against these divergent strains, either by using broadly cross-reactive gp41 group M peptides or by including specific group O peptides from this region. However, identification and monitoring of

HIV variants are essential for maintaining the sensitivity of current screening assays. We report here on the genetic characterization of the immunodominant region from gp41 for 13 new HIV-1 group O samples from 6 different African countries.

Patients were identified as being infected with an HIV-1 group O virus, using a specific serological testing algorithm as previously described.⁴ Briefly, sera were tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using a combination of V3 peptides from ANT-70 and MVP-5180, and all reactive samples were retested in a line immunoassay based on V3 peptides from different M and O strains (consensus M, M-Mal, O-ANT-70, O-V1686, and O-MVP5180; Research Products, Innogenetics, Ghent, Belgium). Among the 13 samples that were further studied genetically, 7 were from Cameroon (95CA-BSD189, 95CA-BSD422, 95CA-BSD649, 95CA-MP340, 95CA-MP95B, 95CA-MP448, and 95CA-MP450), 2 were from Gabon (95GA-189 and 95GA-533), and the others were from Chad (95TD-320), Nigeria (96NG-KGT008), Senegal (95SN-MP331), and Niger (95NE-772P94). For five samples DNA was extracted from primary or cultured peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using the IsoQuick isolation kit (Microprobe, Garden Grove, CA). For the remaining samples viral RNA was extracted from sera and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed as described previously,⁴ using 0.5 μ M reverse primer (41-4). A nested PCR was used to amplify a fragment of approximately 420 bp. Outer primers allow amplification of HIV-1 from groups O and M

¹Projet SIDAK, Laboratoire Rétrovirus, ORSTOM, 34032 Montpellier, France.

²Projet SIDAK, Hôpital Le Dantec, Université Cheik Anta Diop, Dakar, Senegal.

³Centre de Transfusion Sanguine, Hôpital Laquintinie, Douala, Cameroon.

⁴Centre Hospitalier Militaire, Yaoundé, Cameroon.

⁵National AIDS Control Programme, Libreville, Gabon.

⁶Laboratoire de Biologie et Banque de Sang, Centre Hospitalier Universitaire, Niamey, Niger.

⁷Laboratory of Biology, University of Calabar, Calabar, Nigeria.

⁸Innogenetics NV, Ghent, Belgium.

(sense 41-1, 5'-GGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCAC-TATGGGCG-3'; antisense 41-4, 5'-TCTGAAACGACAGAG-GTGAGTATCCCTGCCTAA-3') and inner primers were determined according to the HIV-1-ANT70 sequence (sense 41-6, 5'-TGGATCCACAGTGTACTGAAGGGTATAGTGCA-3'; antisense 41-7, 5'-CATTTAGTTATGTCAAGCCAATTCCA-AA-3'). PCRs were performed in a final volume of 100 μ l containing 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, a 0.2 mM concentration of each deoxynucleoside triphosphate, 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (Promega, Madison, WI), and a 0.4 μ M concentration of each primer. After an initial denaturation step of 3 min at 94°C, 35 cycles were performed at 94°C for 20 sec, 50°C for 30 sec, and 72°C for

1 min, followed by a final extension for 7 min. For the second round, 5 μ l from the first amplification was subjected to the same cycling conditions. Both strands of each fragment were sequenced, using an Applied Biosystems sequencer (model 373A; Applied Biosystems/Perkin-Elmer, Foster City, CA) and a dideoxy terminator procedure, as specified by the manufacturer. Direct sequencing of the PCR products was performed and ambiguities observed at a limited number of positions in some sequences were resolved when joining the overlapping fragments.

The length of the sequenced fragment ranges from 330 to 351 bp owing to insertions and deletions. Phylogenetic trees were constructed from nucleotide sequences (final alignment,

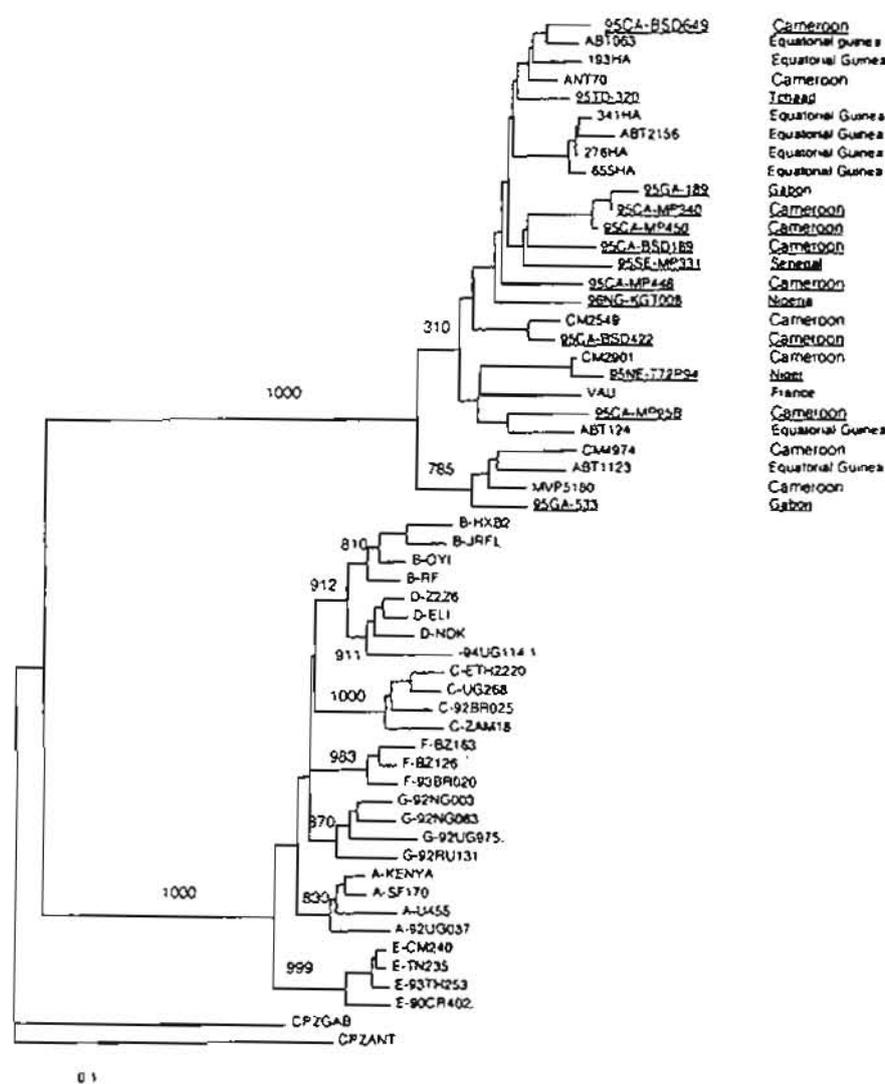


FIG. 1. Phylogenetic tree analyses for the sequenced region of the transmembrane glycoprotein for HIV-1 group O and M strains. The viruses characterized in this study are underlined. Phylogenetic relationships were determined by the neighbor-joining method and implemented using CLUSTAL W. A total of 301 sites was analyzed (gaps deleted from nucleotide alignment). The numbers given at the branch points represent bootstrap values out of 1000 obtained for the neighbor-joining methods. The sequences have been submitted to the EMBL database under accession numbers Y09767 (95NE-772P94), Y09768 (95CA-MP448), Y09769 (95CA-BSD649), Y09770 (95GA-533), Y09771 (95CA-MP95B), Y09772 (95GA-189), Y09773 (95CA-MP450), Y09775 (95TD-320), Y09776 (95CA-BSD189), Y09777 (96NG-RGT008), Y09778 (95CA-BSD422), Y09779 [95SE-MP331 (FABA)], and Y09780 (95CA-MP340).

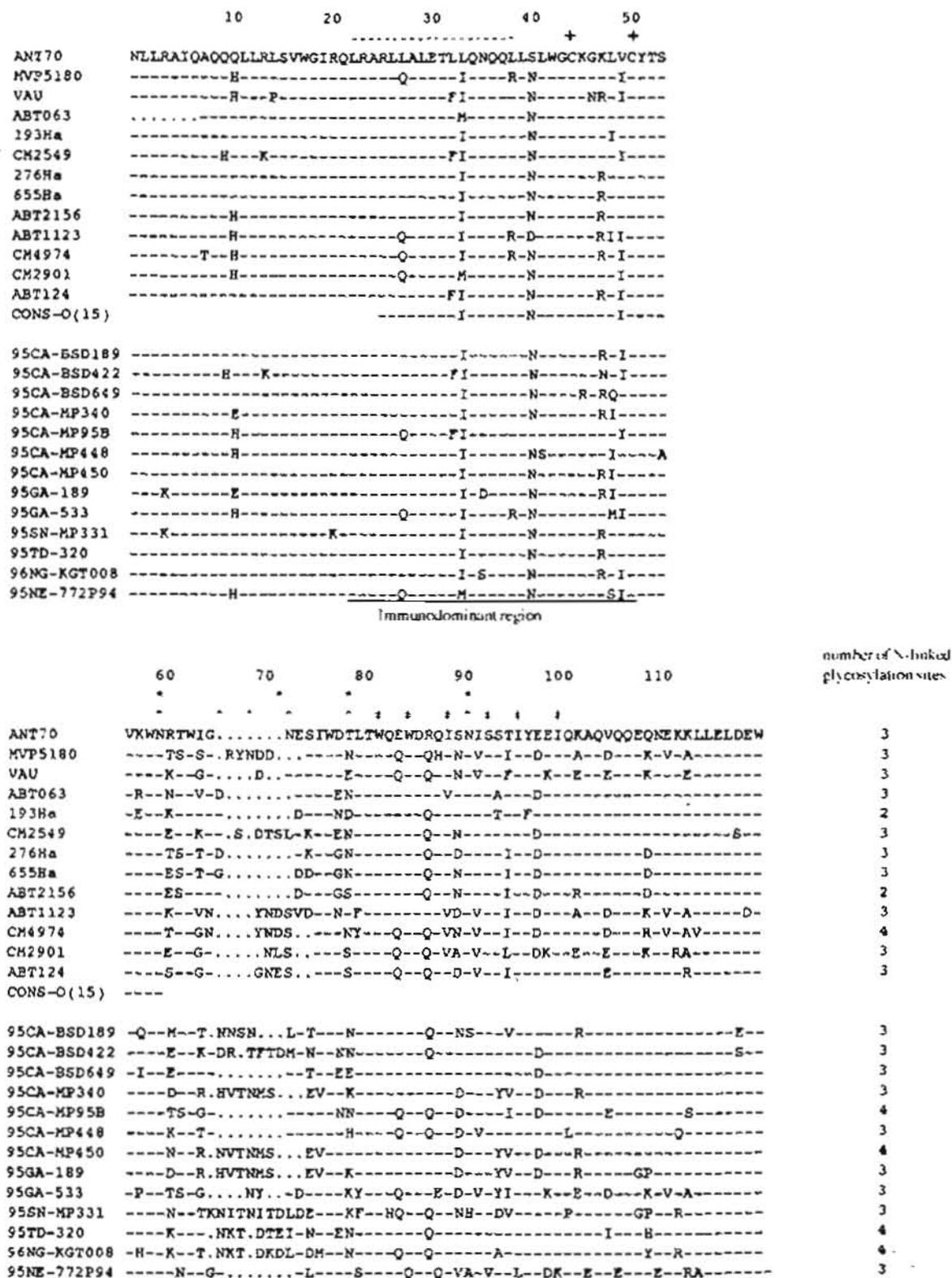


FIG. 2. Alignment of the deduced amino acid sequences of group O strains compared with previously published sequences.^{2,3,10,14-16} Dots (.) represent gaps introduced to maximize alignment and dashes (-) represent identical amino acids. The immunodominant region is underlined; within this domain a diamond (◊) indicates the immunosuppressive peptide (ISU-peptide) by analogy to HIV-1 group M viruses, and a plus (+) indicates the two conserved cysteine residues flanking the principal immunodominant domain (PID). The potential N-linked glycosylation sites [N-X-(T or S)], which are shown by carets (^) above the asparagine residues, are indicated to the right of the sequences. The positions of the N-linked glycosylation sites in group M sequences are indicated by asterisks (*). A double dagger (‡) refers to conserved residues involved in cell fusion entry.

301 bp, after exclusion of the gaps) by the neighbor-joining and maximum-parsimony methods, with the new sequences described here and group O sequences from the database together with reference strains from group M representing subtypes A to G. Consistent results were obtained by the two methods. The phylogenetic analysis showed that all our samples belonged to group O, but in contrast to group M viruses no subtypes could be identified (Fig. 1). Within group O, the samples can be divided into those that branch with ANT-70, VAU, or MVP-5180, although these subgroups were not supported by high bootstrap values. The majority of the samples branch with the ANT-70 strain. The evolutionary distance matrix, calculated using DNAdist (Kimura two-parameter method) on the same strains, and by using the same matrix as for the phylogenetic analysis, shows that group O isolates can be as closely related to each other as are isolates within a group M subtype, and as distantly related as observed between group M subtypes. The mean distance among the group M strains was 14% (ranging from 1.7% to 23%), with an intrasubtype distance ranging from 3.7 to 7% and an intersubtype distance ranging from 10 to 19%. The mean distance among group O strains was also 14% and ranged from 1.2 to 24%.

Figure 2 shows the alignment of the protein sequence from the gp41 region that was PCR amplified. The sequenced region includes the immunodominant region (indicated in Fig. 2), which can be divided into an immunosuppressive (ISU) peptide of 17 amino acids and an immunodominant cysteine loop. Within group O isolates, the immunodominant region is relatively conserved, when comparing our sequences and previously published sequences, but group O isolates are quite divergent from the group M subtype B isolates, which may explain the less efficient detection of group O infection by immunoassays based on group M subtype B reagents.¹⁴⁻¹⁶

Among group M viruses, four N-linked glycosylation sites are conserved in the gp41 extracellular domain, and they have been shown to play important roles in the extracellular processing of gp160^{17,18} and in the fusogenic properties of gp41.^{19,20} Most of the group O viruses described here (9 of 13) contain only 3 potential N-linked glycosylation sites, whereas only 4 strains contain 4 sites. Among the already published strains, two have only two N-linked glycosylation sites. Only the position of the first site is highly conserved (position 60 in the alignment) and the positions of the three other sites vary among the strains, in contrast to group M viruses, in which these sites are conserved at fixed positions. Differences in the N-linked glycosylation patterns between groups M and O have also been reported for the C2V3 region of the envelope.⁶ The differences observed between the two HIV-1 groups in the gp41 region raise the possibility that these viruses use different mechanisms, for example, in the extracellular processing of the envelope precursor or in the domains involved in membrane fusion. Finally, the sequenced region also includes critical residues that are involved in cell fusion in group M strains. These residues are also highly conserved in group O and include W81, W84, I88, S92 (instead of T in group M), I95, and I99.²¹

The immunodominant region of gp41 plays a central role in the identification of antibody against HIV-1. Detection of all HIV-infected individuals continues to be one of the major goals to prevent the spread of HIV infection. Therefore sequence in-

formation on the gp41 immunodominant region among group O isolates is of major interest, especially in the design of future serologic assays.

ACKNOWLEDGMENTS

Projet SIDA is supported by the Agence Nationale pour les Recherches contre le SIDA (ANRS) and the French Ministry for Cooperation. This study was also supported by Grants 95017 and 95031 from the Global AIDS Program of the World Health Organization and by Contract IC18CT96-0110 from the European Community. We thank Florian Liegeois, Delphine Parel, and Claire Mulanga-Kabeya for technical assistance. F.B.-R. was supported by a postdoctoral fellowship from SIDACTION.

REFERENCES

- Myers G, Korber B, Hahn BH, *et al.* (eds.). *Human Retroviruses and AIDS: A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences*. 1995. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico, 1995.
- Vanden Haesevelde M, Decourt JL, De Leys R, *et al.*: Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent human immunodeficiency virus isolate. *J Virol* 1994;68:1586-1596.
- Gürtler LG, Hauser PH, Eberle J, *et al.*: A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J Virol* 1994;68:1581-1585.
- Peeters M, Gueye A, Mboup S, *et al.*: Geographic distribution of HIV-1 group O viruses in Africa. *AIDS* 1997;11:493-498.
- Zekeng L, Gurtler L, Afaeze A, *et al.*: Prevalence of HIV-1 subtype O infection in Cameroon: Preliminary results. *AIDS* 1994;8:1626-1628.
- Loussert-Ajaka I, Chaix ML, Korber B, *et al.*: Variability of human immunodeficiency virus group O strains isolated from Cameroonian patients living in France. *J Virol* 1995;69:5640-5649.
- Hampel H, Sawitzky D, Stöffler-Meilicke M, Groh A, Schmitt M, Eberle J, and Gürtler L: First case of HIV-1 subtype O infection in Germany. *Infection* 1995;6:369-370.
- Soriano V, Gutierrez M, Garcia-Lerma G, *et al.*: First case of group O infection in Spain. *Vox Sang* 1996;71:66.
- Centers for Disease Control and Prevention: Identification of HIV-1 group O infection. Los Angeles County, California. *MMWR* 1996;45:561-564.
- Chameau P, Borman AM, Quillent C, *et al.*: Isolation and envelope sequence of a highly divergent HIV-1 isolate: Definition of a new HIV-1 group. *Virology* 1994;205:247-253.
- Jonassen T, Steen-Johansen K, Berg E, Hungnes O, Lindboe C, Froland S, and Grinde B: Sequence analysis of HIV-1 group O from Norwegian patients infected in the 1960s. *Virology* 1997;231:43-47.
- Loussert-Ajaka I, Ly TD, Chaix ML, *et al.*: HIV-1/HIV-2 seronegativity in HIV-1 subtype O infected patients. *Lancet* 1994;343:1393-1394.
- Schable C, Zekeng L, Pau C-P, *et al.*: Sensitivity of United States HIV antibody tests for detection of HIV-1 group O infections. *Lancet* 1994;344:1333-1334.
- Brennan CA, Hackett J Jr, Zekeng L, *et al.*: Sequence of gp41env immunodominant region of HIV type 1 group O from West Central Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997;13:901-904.
- Eberle J, Loussert-Ajaka I, Brust S, *et al.*: Diversity of the immunodominant epitope of gp41 of HIV-1 subtype O and its validity for antibody detection. *J Virol Methods* 1997;67:85-91.

16. Hunt J, Golden A, Lund J, *et al.*: Envelope sequence variability and serologic characterization of HIV type 1 group O isolates from Equatorial Guinea. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997;13:995-1005.
17. Oldstone MB, Tishon A, Lewicki H, Dyson HU, Feher VA, Assa-Munt N, and Wright PE: Mapping of the anatomy of the immunodominant domain of the human immunodeficiency virus gp41 transmembrane protein: Peptide conformation analysis using monoclonal antibodies and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Virol* 191;65:1727-1734.
18. Dash B, McIntosh A, Barrett W, and Daniels R: Deletion of a single N-linked glycosylation site from the transmembrane envelope protein of human immunodeficiency virus type 1 stops cleavage and transport of gp160 preventing Env-mediated fusion. *J Gen Virol* 1994;75:1389-1397.
19. Dederá D, Gu R, and Ratner L: Conserved cysteine residues in the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane envelope protein are essential for precursor envelope cleavage. *J Virol* 1992;66:1207-1209.
20. Weissenhorn W, Dessen A, Harrison SC, Skehel JJ, and Wiley DC: Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature (London)* 1997;397:426-430.
21. Chain DC, Fass D, Berger JM, and Kim PS: Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 1997;89:263-273.

Address reprint requests to:

Martine Peeters

ORSTOM, Laboratoire Rétrovirus

911, Avenue Agropolis, BP 5045

34032 Montpellier cedex 1, France

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS

Les nombreuses études consécutives à la description de la première souche de VIH en 1983 (25) ont permis de montrer que cette espèce virale du sous-genre « Lentivirus des Primates » est génétiquement très hétérogène. Le premier niveau de diversité définit deux types viraux : VIH-1 et VIH-2.

Le VIH-1 est responsable de la pandémie du SIDA. L'étude phylogénétique d'une multitude de souches d'origines géographiques diverses a abouti à la description de trois groupes. Le groupe M concerne la grande majorité des souches décrites et renferme 9 sous-types « pur », des sous-sous-types, des CRF et autres recombinants. Le groupe O est subdivisible en 5 clusters phylogénétiques au moins (352). Le groupe N ne renferme actuellement que quelques souches décrites (20, 304).

Le VIH-2, moins pathogène est quasi-restreint à l'Afrique de l'Ouest. Il comprend actuellement 7 sous-types A-G (62, 108, 351), et certains arguments phylogénétiques sont en faveur d'une définition de groupes de VIH-2.

Le rôle majeure du VIH-1 dans la pandémie du SIDA justifie toute la mobilisation d'énergie et de moyens pour permettre à la communauté scientifique de cerner toutes les caractéristiques biologiques et épidémiologiques de ce virus, et de trouver des traitements curatifs et préventifs efficaces.

L'importance de la maîtrise de l'épidémiologie moléculaire du VIH tient aux conséquences de sa diversité génétique sur le diagnostic biologique, la transmission, la pathogénèse, la sensibilité aux ARV et le développement vaccinal (244, 322).

L'objectif général de cette thèse était de documenter la diversité génétique du VIH-1 au Niger. C'est une contribution aux activités non seulement de l'Action Coordonnée N°12 de l'ANRS, mais aussi du Réseau Africain de Recherche sur le SIDA (RARS) et du Réseau Nigérien de Recherche sur le SIDA.

(RNRS).

Les résultats de nos différents travaux visent l'atteinte des **cinq objectifs spécifiques annoncés** :

-Objectif spécifique 1 : « déterminer les variants génétiques de VIH-1 du groupe M circulant au Niger, dans une population de personnes vivant avec le VIH ».

L'étude moléculaire des souches de VIH-1 du groupe M a montré que, malgré la faible séroprévalence du VIH estimée à 0,87% au Niger en 2002, une assez grande diversité de variants circulent dans ce pays. En effet, sur la base de l'analyse phylogénétique des séquences V3-V5 dans le gène *env* et p24 dans le gène *gag*, 14 variants différents, dont 11 recombinants, ont été caractérisés sur un échantillon de 110 souches.

Cette diversité de recombinants montre éloquemment que les co-infections et les surinfections avec des sous-types ou des recombinants différents doivent survenir plus souvent qu'on le pense. La fréquence des recombinants d'une ou plusieurs générations qui en résulterait va dépendre de la prévalence relative des variants circulant dans la région considérée, des risques de re-contamination liés au type d'exposition, et de la « viabilité » intrinsèque des virus mosaïques engendrés.

Les deux variants prédominants sont le CRF02_AG et le CRF06_cpx qui se recombinent entre-eux. C'est ainsi que 9% de nos souches sont des recombinants inter-CRFs. D'autres recombinants de seconde génération circulent également. Ils impliquent le CRF02_AG avec les sous-types A, G ou B-D, à l'instar des recombinants CRF02_AG/C et CRF02_AG/G décrits par *Janssens et al (148)*.

Les 110 séquences *env* (V3V5) et autant de séquences *gag* (p24), correspondant aux 14 variants génétiques sont référencées dans la base de donnée GenBank, sous les numéros d'accès AJ429810 à AJ429921 pour *env* et AJ429922 à AJ430031 pour *gag*.

Il n'y a pas de différences statistiquement significatives dans la distribution d'un variant donné entre 1997 et 2000. Le CRF02 reste toujours majoritaire, suivi du CFR06. Il y a par contre une diversification des variants dont le nombre passe de 7 en 1997 à 13 en 2000, ainsi qu'une augmentation sensible de la proportion des recombinants inter-CRF02/CRF06 : de 6,9% en 1997 à 10,5% en 2000.

-Objectif spécifique 3 : « analyser le génome complet de souches particulières de VIH-1 du groupe M ».

Le séquençage génomique complet de trois des souches complexes CRF02_AG / CRF06-cpx nous a permis de préciser que les points de recombinaison sont différents d'une souche à l'autre, ce qui n'est pas en faveur de l'émergence d'une nouvelle forme recombinante circulante, mais montre le caractère dynamique et évolutif de la recombinaison génétique du VIH-1(243). Ce processus peut d'ailleurs impliquer des virus de groupes différents, car des recombinants inter-groupes ont déjà été décrits (251, 316). Peut-être pourrait-on s'attendre à des recombinants inter-typiques au cours des doubles infections VIH-1/VIH-2 ? Finalement, l'évolution probable de la diversité génétique du VIH-1 pourrait être un recul progressif des sous-types « purs » au profit des recombinants plus ou moins complexes à long terme.

Les 3 séquences génomiques complètes de ces recombinants à structure mosaïque complexe sont référencées dans la base de données EMBL, sous les numéros d'accèsion AJ508595 (97NE-003), AJ508596 (00NE095) et AJ508597 (00NE036).

-Objectif spécifique 4 : « étudier rétrospectivement la co-circulation du VIH-1 groupe O au Niger ».

Notre étude séro-épidémiologique sur les virus du groupe O a rapporté cinq cas d'infection. Ils étaient tous parmi les 1459 sérums VIH-1 positifs selon l'algorithme de dépistage utilisant les tests disponibles avant la découverte des variants divergents du groupe O.

Aucun cas n'a été dépisté parmi les 1160 sérums VIH indéterminés ou VIH négatifs par les mêmes tests. La crainte majeure qu'avait suscitée l'avènement de ces virus était d'échapper à la détection par certains tests sérologiques d'alors, surtout en transfusion sanguine. Ce cas de figure n'a pas été heureusement retrouvé dans notre étude.

-Objectif spécifique 5 : « caractériser génétiquement les souches éventuelles de VIH-1 groupe O ».

En raison de l'état de conservation des sérums d'une part, et de l'impossibilité de retrouver nos cinq patients positifs O, la caractérisation moléculaire n'a été possible que dans un seul cas, au niveau d'un domaine situé dans la région gp41 du gène *env*. La séquence *env* obtenue, la toute première séquence VIH provenant du Niger, est référencée dans la base de données EMBL, sous le numéro d'accession Y09767.

PERSPECTIVES

Nos perspectives en matière de recherche sur le VIH au Niger s'incrivent dans le renforcement de notre participation au travail en réseau, pour :

-poursuivre la caractérisation moléculaire des souches de VIH-1 provenant non seulement de malades hospitalisés, mais aussi d'autres catégories de personnes infectées. A ce titre, nous espérons analyser très prochainement tous les prélèvements de sang total positifs collectés sur papier buvard lors de l'enquête nationale de prévalence du VIH et des IST que nous venons de réaliser en 2002. Il sera alors possible de préciser la distribution des variants dans la population générale par région, et dans les différents groupes cibles de cette étude : travailleuses du sexe, routiers, prisonniers, militaires, lycéens et enseignants.

-poursuivre le génotypage du VIH-2 que nous avons suspendu après quelques résultats préliminaires sur une dizaine de souches qui mettent en évidence

la circulation des soustypes A et B.

-participer de façon active au suivi biologique de l'efficacité du traitement antirétroviral au Niger, notamment par la surveillance de l'émergence des résistances aux ARV.

Toutes ces activités se feront en collaboration étroite avec le Laboratoire de Bactériologie-Virologie du CHU Le Dantec à Dakar et l'Unité de Recherche 36 de l'IRD à Montpellier.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Adjorlolo-Johnson G., De Cock K. M., Ekpini E., Vetter K.M., Sibailly T., Brattegaard K., Yavo D., Doorly R., Whitaker J.P., Kestens L. (1994).** Prospective comparison of mother-to-child transmission of HIV-1 and HIV-2 in Abidjan, Ivory Cost. *J Am Med Assoc*, 272: 462-466.
2. **Agence Nationale de Recherche sur le Sida (2002).** Initiative Sénégalaise d'Accès aux Antirétroviraux : analyses économique, sociale, comportementale et médicale. Collection Sciences Sociales, ANRS.
3. **Alaeus A., Leitiver T., Lidman K., Albert J.(1997).** Most HIV-1 genetic subtypes have entered Sweden. *AIDS*, 11: 199-202.
4. **Alaeus A., Lidman K., Björkman A., Giesecke J., Albert J.(1999).** Similar rate of disease progression among individuals infected with HIV-1 genetic subtypes A-D. *AIDS*, 13: 901-907.
5. **Alaeus A., Lidman K., Sonnerborg A., Albert J.(1997).** Subtype -specific problems with quantification of plasma HIV-1 RNA. *AIDS*, 11: 859 - 865.
6. **Al-Harhi L., Siegel J., Spritzler J., Pottage J., Agnoli M., Landay A.(2000).** Maximum suppression of HIV replication leads to restoration of HIV-specific responses in early HIV disease. *AIDS*, 14: 761-770.
7. **Alizon M.(1999).** Entrée des virus de l'immunodéficience humaine dans la cellule. *Médecine Thérapeutique*, 5(hors sériel): 6-13.
8. **Alizon M.(1999).** Blocage de l'entrée du VIH. *Médecine Thérapeutique*, 5(hors sériel): 14-16.
9. **Alonso A, Cujec T.P, Peterlin B.M (1994).** Effects of human chromosome 12 on interactions between Tat and TAR of human immunodéficency virus type 1. *J Virol*, 6: 6505.
10. **Anacelle R., Bletry O., Baglin A.C., Brun-Vezinet F., Rey M.A, Godeau P. (1987).** Long incubation period for HIV-2 infection. *Lancet*, i : 688-689.
11. **Andersson S., Norrgren H., Da Silva Z., Biague A., Bamba S., Kwok S., Christopherson C., Biberfeld G., Albert J.(2000).** Plasma viral load in HIV-1 and HIV-2 singly and dually infected individuals in Guinea-Bissau, West Africa: significantly lower plasma virus set point in HIV-2 infection than in HIV-1 infection. *Arch Intern Med*, 160: 3286-3293.

12. **Andreasson P., Dias F., Naucler A., Andersson S., Biberfeld G.(1993).** A prospective study of vertical transmission of HIV-2 in Bissau, Guinea-Bissau. *AIDS*, 7: 989-993.
13. **Apatrei C., Descamps D., Collin G., Loussert-Ajaka I., Damont F., Duca M., Simon F., Brun-Vézinet F.(1998).** Human immunodeficiency virus type 1 subtype F revers transcriptase sequence and susceptibility. *J Virol*, 72: 3435-3448.
14. **Apatrei C., Loussert-Ajaka I., Collin G., Letourneur F., Duca M., Saragosti S., Simon F.(1997).** HIV type 1 subtype F sequences in roumanian children and adults. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 13: 363-365.
15. **Apatrei C., Loussert-Ajaka I., Descamps D., Damord F., Saragosti S., Brun-Vezinet F., Simon F.(1996).** Lack of screening test sensivity during HIV-1 non-subtype B seroconversions. *AIDS*, 10: 57-60.
16. **Appay V., Nixon D.F., Donahoe S.M., Gillepsie G.M., Dong T., King A., Oggs G.S., Spiegel H.M., Conlon C., Spina C.A., Havlir D.V., Richman D.D., Waters A., Easterbrook P., McMichael A.J., Rowland-Jones S.L.(2001).** HIV-specific CD8(+) T celle produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med*, 192: 63-75.
17. **Arnald C., Narlow K. L., Kaye S., Loveday C., Balfe P., Clenthey J. P.(1995).** HIV type 1 sequence subtype G transmission form mother to infant: failure of variant sequence species to amplify in the Roche Amplicor test. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 11: 999-1001.
18. **Artenstein A.W., VanCott T.C., Mascola J.R., Carr J.K., Hegerich P.A., Gaywee J., Sanders-Buell E., Robb M.L., Dayhoff D.E., Thitvichianlert S.(1995).** Dual infection with human immunodeficiency virus type 1 of distinct envelope subtypes in humans. *J Infect Dis*, 171: 805-810.
19. **Autran B., Carcelain G., Gorochov G., Renaud M., Blanc C., Li T., Tubiana R., Calvez V., Leibowitch J., Katlama C., Debré P.(1999).** Reconstitution immune sous traitements antirétroviraux de l'infection à VIH. *Médecine Thérapeutique*, 5 (hors sériel): 49-55.
20. **Ayouba A., Souquières S., Njinku B., Martin P.M., Mueller-Trutwin M.C., Roques P., Barré-Sinoussi F., Maucière P., Simon F., Nerrienet E.(2000).** HIV-1 group N among HIV-1-seropositive individuals in Cameroon. *AIDS*, 14: 2623-2625.
21. **Bagasra O., Lavi E., Bobroski L., Khalili K., Pestaner J.P., Tawadros R.,**

- Pomerantz R.J.(1996).** Cellular reservoirs of HIV-1 in the cerebral nervous system of infected individuals : identification by the combination of *in situ* polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *AIDS*,10: 573-585.
- 22. Barin F., Mboup S., Denis F., Kanki P., Allan J.S., Lee T.H., Essex M.(1985).** Serological evidence for virus related to simian T-lymphotropic retrovirus III in residents of West Africa. *Lancet*, 2: 1387-1389.
- 23. Barin F., Lahbabbi Y., Buzelay L., Lejeune B., Baillou-Beaufils A., Denis F., Mathiot C., Mboup S., Vithayasai V., Dietrich U., Goudeau A.(1996).** Diversity of HIV-1 genotypes A to E : an approach for HIV-1 serological subtyping. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 12 : 1279-1289.
- 24. Barlow K.L., Toswill J.H.C., Clewley J.P.(1995).** Analysis and genotyping of PCR products of the Amplicor HIV-1 kit. *J Virol Meth*, 52: 65-74.
- 25. Barré-Sinoussi F., Cherman J.C., Rey F., Nugeyre M.T., Chamaret S., Gruest J., Dauguet C., Axler-Blin C., Vezinet-Brun F., Rouzioux C., Rozenbaum W., Montagnier L.(1983).** Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220: 868-871.
- 26. Bebenek K., Kunkul T.A.(1993).** The fidelity of retroviral reverse transcriptase. *in* Skalka A. M, Goff S.P (eds), Cold Spring Harbor Laboratory, 85-102.
- 27. Becquart P., Chomont N., Roques P., Ayouba A., Kazatchkine M.D., Belec L., Hocini H.(2002).** Compartmentalization of HIV-1 between breast milk and blood of HIV-infected mothers. *Virology*, 300: 109-117.
- 28. Beerenwinkel N., Schmidt B., Walter H., Kaiser R., Lengauer T., Hoffmann D., Korn K., Selbig J.(2002).** Diversity and complexity of HIV-1 drug resistance: a bioinformatics approach to predicting phenotype from genotype. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 8271-8276.
- 29. Berger A., Rabenau H.F., Stief A., Troonen H., Doerr H.W.(2001).** Evaluation of the new LCx HIV RNA quantitative assay: comparison with the Cobas Amplicor HIV Monitor assay. *Med Microbiol Immunol (Berl)*, 190: 129-134.
- 30. Biron F., Bouhour D., Ataman-Onal Y., Verrier B.(2000).** Primo-infection par le virus de l'immunodéficience humaine. *Virologie*, 4: 11-19.

31. **Blanche S., Rouzioux C., Guichard-Mascato M-L.(1989).** A prospective study of infants born to women seropositive for human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med*, 320: 1643-1648.
32. **Bobkov A., Gheinsong-Popov R., Salminen M., Mc Cutchan F., Louwagie J., Ariyoshi K., Whittle H., Weber J.(1996).** Complex mosaic structure of the partial envelope sequence from a gambian HIV type 1 isolate. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 12: 169-71.
33. **Blond J.-L., Cheynet V., Mallet F.(2001).** Signification biologique des rétrovirus endogènes humains. *Virologie*, 5: 91-111.
34. **Boeri E., Giri A., Lillo F., Ferrari G., Varnier O.E., Ferro A., Sabbatani S., Saxinger W.C., Frachini G.(1992).** In vivo genetic variability of the human immunodeficiency virus type 2 V3 region. *J Virol*, 66: 4546-4550.
35. **Bogerd H.P., Fridell R.A., Madore S., Cullen B.R.(1994).** A novel cellular cofactor for HIV-1 Rev. *Cell*, 82 : 485.
36. **Bonner K.(2001).** Male circumcision as an HIV control strategy: not a "natural condom". *Reprod Health Matters*, 9: 143-155.
37. **Borman A.M., Quillent C., Charneau P., Kean K.M., Clavel F.(1995).** A highly defective HIV-1 group O provirus : evidence for role of local sequence determinants in G/A hypermutation during negative-strand DNA synthesis. *Virology*, 208: 601-609.
38. **Bouyac-Bertoia M., Hassaine G., Vigne R., Decroly E.(1999).** Fonctions de la protéine Vif dans la réplication du virus de l'immunodéficience humaine de type 1. *Virologie*, 3: 379-387.
39. **Bredberg-Raden U., Urassa W., Urassa E., Lyamuya E., Msemo G., Kawo G., Kasimoto T., Massawe A., Grankvist O., Mbena E., Karlsson K., Mhalu F., Biberfeld G.(1995).** Predictive markers for mother-to-child transmission of HIV-1 in Dar es Salaam, Tanzania. *J Acquir Imm Defic Syndr*, 8: 182-187.
40. **Bredell H., Hunt G., Morgan B., Tiemessen C.T., Martin D.J., Morris L.(2000).** Identification of HIV type 1 intersubtype recombinants in South Africa using env and gag Hetroduplex Mobility Assays. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 16: 493-497.
41. **Brennan R.O., Durack D.T.(1981).** Gay compromise syndrome. *Lancet*. 2: 1338-1339.

42. **Brevan M.J., Braciale T.J.(1995).** Why can't cytotoxic T cells handle HIV ? *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 5765-5767.
43. **Brossard Y., Aubin J.T., Mandelbrot L., Bignozzi C., Brand D., Chaput A., Roume J., Mulliez N., Mallet F., Barin F., Brechot C., Goudeau A., Huraux J.M., Barrot J., Blot P., Chavinie J., Ciraru-Vigneron N., Engelman P., Herve F., Papiernik E., Henrion R.(1995).** Frequency of early in utero HIV-1 infection : a blind DNA polymerase chain reaction study on 100 featal thymuses. *AIDS*, 9 : 359-366.
44. **Brun-Vézinet F., Clavel F.(1999).** Résistance du VIH aux antirétroviraux : mécanisme et outils de mesure. *Médecine Thérapeutique*, 5 (hors série1) : 24-31.
45. **Brun-Vézinet F., Clavel F., Yéni P.(2000).** Un point sur la résistance aux antirétroviraux (<http://www.glaxowellcome.fr/vih/sidactualite/>)
46. **Brun-Vézinet F, Dormont J (1996).** Mesure de charge virale dans le suivi des patients atteints par le VIH: méthodes et indications. *Médecine-Sciences*, Flammarion.
47. **Bryceson A., Tomkins A., Ridley D., Warhurst D., Goldstone A., Bayliss G., Toswill J., Parry J.(1988).** HIV-2 associated AIDS in the 1970s [letter]. *Lancet*, 2 : 221.
48. **Buenagoro L., Buenagoro F.M., Giraldo G., Ensoli B.(1994).** The human immunodeficiency virus type 1 Tat protein transactivates Tumor Necrosis Factor beta gene expression through a TAR-like structure. *J Virol*, 68: 2677-2682.
49. **Burgard M., Mayaux M-J., Blanche S., Ferroni A., Guichard-Moscato M.L., Allemon M.C., Ciraru-Vigneron N., Firtion G., Floch C., Guillot F.(1992).** The use of viral culture and p24 antigen testing to diagnose human immunodeficiency virus infection in neonates.The HIV infection in newborns french collaborative study group. *New Engl J Med*, 317: 1192-1197.
50. **Butto S., Argentini C., Mazzella A.M., Iannotti M.P., Leone P., Nicolosi A., Rezza G. (1997).** Dual infection with different strains of the same HIV-1 subtype. *AIDS*, 11: 694-695.
51. **Cao Y.Z., Qin L.M., Zhang L.Q., Ho D.D.(1995).** Virologic and immunologic characterization of a long-term survivors of human immunodeficiency virus type1 infection. *N Engl J Med*, 332: 201-208.
52. **Care International au Niger (2003).** Enquête Nationale de Prévalence VIH/IST au

Niger, en 2002. Rapport Technique NER061.

53. Carr J.K., Avila M., Gomez-Carrillo M., Salomon H., Hierholzer J., Watanaveeradej V., Pando M.A., Negrete M., Russell K.A., Sanchez J., Birx D.L., Andrade R, Vinales J., McCutchan F.E.(2001). Diverse BF recombinants have widely spread since the introduction of HIV-1 into South America. *AIDS*, 15: F41-F47.

54. Carr J.K., Laukkanen T., Salminen M.O., Albert J., Alaeus A., Kim B., Sanders-Buell E., Birx D.L., McCutchan F.E.(1999). Characterization of subtype A HIV-1 from Africa by full genome sequencing. *AIDS*, 13: 1819-1826.

55. Carr J.K., Salminen M.O., Albert J., Sanders-Buell E., Gotte D., Birx D.L., McCutchan F.E.(1998). Full genome sequences of human immunodeficiency virus type 1 subtypes G and A/G intersubtype recombinants. *Virology*, 247: 22-31.

56. Carr J.K., Salminen M.O., Koch C., Gotte D., Artenstein A.W., Hegerich P.A., St Louis D., Burke D.S., McCutchan F.E.(1996). Full-length sequence and mosaic structure of a human immunodeficiency virus type 1 from thailand. *J Virol*, 70: 5935-5943.

57. Centers For Diseases Control (1981). Kaposi's sarcoma and Pneumocistis pneumonia among homosexual men in New York city and California. *Morb Mortal Wkly Rep*, 30:305-308.

58. Chaix-Baudier M.L., Chappey C., Burgard M., Letourneur F., Igual J., Saragosti S., Rouzioux C.(1998). First case of mother-to-child HIV type 1 group O transmission and evolution of C2V3 sequences in the infected child. French HIV pediatric Cohort Study Group. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 14:15-23.

59. Charneau R., Borman A.M., Quillent C., Guetard D., Chamaret S., Cohen J., Remy G., Montagnier L., Clavel F.(1994). Isolation and envelope sequence of a highly divergent HIV-1 isolate : definition of a new HIV-1 group. *Virology*, 205: 247-253.

60. Cheingsong-Popov R., Osmanov S., Pau C.P., Schochetman G., Barin F., Holmes H., Francis G., Ruppach H., Dietrich U., Lister S., S., Weber J.(1998). Serotyping HIV type 1 infections: definition, relationship to viral genotypic subtypes, and assay evaluation.WHO Network for HIV Isolation and Characterization. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 14: 311-318.

61. Cheng-Mayer C.(1990). Biological and molecular features of HIV-1 related to tissue tropism. *AIDS*, 4 (suppl 1) : S49-S56.

62. Chen Z., Luckay A., Sodora D.L., Telfer P., Reed P., Gettie A., Kanu J., Sadek R.F., Yee J., Ho D.D., Zhang L., Marx P.(1997). Human Immunodeficiency Virus type 2 (HIV-2) seroprevalence and characterization of a distinct HIV-2 genetic subtype from the natural range of Simian Immunodeficiency Virus-infected Sooty Mangabeys. *J Virol*, 71: 3953-3960.
63. Chidzonga M.M.(1996). Noma (*Cancrum oris*) in human immunodeficiency virus/acquired immune deficiency syndrome patients. *J Oral Maxillofac Surg*, 54: 1056-1060.
64. Clewley J.P.(1995). Genetic diversity and HIV detection by PCR (letter). *Lancet*, 346: 1489.
65. Clavel F., Guetard D., Brun-Vezinet F., Chamaret S., Rey M.A., Santos-Ferreira M.O., Laurent A.G., Dauguet C., Katlama C., Rouzioux C., et al.(1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*, 233: 433-346.
66. Coffin J.M.(1995). HIV population dynamics in vivo : implications for genetic variation, pathogenesis and therapy. *Science*, 267: 483-489.
67. Coffin J.M., Essex M., Gallo R., Graf T.M., Hinuma Y., Hunter E., Jaenisch R., Nusse R., Orszlan S., Svoboda J., Teich N., Toyoshima K., Varmus H (2001). Retroviridae, VIth ICTV report (http://life.bio2.edu/Ictv/fs_retro.html)
68. Connor E.M., Sperling R.S., Gelber R., Kiseley P., Scott G., O'Sullivan M.J., Van Dyke R., Bey M., Shearer W., Jacobson R.L., et al.(1994). Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. *N Engl J Med*, 331: 1173-1180.
69. Cooney A.J., Tsai S.Y., O'Malley B.W., Tsai M-J.(1991). Chicken Ovalbumine Upstream Promoter transcription factor binds to a negative regulatory element of the human immunodeficiency virus long terminal repeat. *J Virol*, 65: 2853.
70. Corbet S., Müller-Trutwin M.C., Versmisse P., Delarue S., Ayouba A., Lewis J., Brunak S., Martin P., Brun-Vézinet F., Simon F., Barré-Sinoussi F., Maucière P.(2000). *env* sequences of Simian Immunodeficiency Viruses from chimpanzees in Cameroon are strongly related to those of Human Immunodeficiency Virus group N from the same area. *J Virol*, 74: 529-534.
71. Cornelissen M., Kapinga G., Zorgdrager F., Goudsmit J.(1996). Human

- immunodeficiency virus type 1 subtypes defined by *env* show high frequency of recombinant *gag* genes. *J Virol*, 70: 8209-8212.
72. Coste J., Montes B., Reynes J., Peeters M., Segarra C., Delaporte E., Segondy M.(1997). Effect of HIV-1 genetic diversity on HIV-1 RNA quantification in plasma : comparative evaluation of three commercial assays. *J Acquir Immune Defic syndr*, 15: 174-175.
73. Damond F., Apatrei C., Robertson D.L., Souquiere S., Lepretre A., Matheron S., Plantier J.C., Brun-Vezinet F., Simon F.(2001). Variability of human immunodeficiency virus type 2 (hiv-2) infecting patients living in France. *Virology*, 280: 19-30.
74. Damond F., Gueudin M., Pueyo S., Farfara I., Robertson D.L., Descamp D., Chene G., Matheron S., Campa P., Brun-Vezinet F., Simon F.(2002). Plasma RNA viral load in human immunodeficiency virus type 2 subtype A and subtype B infections. *J Clin Microbiol*, 40: 3654-3659.
75. Delaporte E., Janssens W., Peeters M., Buvé A., Dibanga G., Perret J.-L., Ditsambou V., Mba J.-R., Georges-Courbot M.-C., Georges A., Bourgeois A., Samb B., Henzel D., Heyndrickx L., Fransen K., Van Der Groen G., Larouze B.(1996). Epidemiological and molecular characteristics of HIV infection in Gabon, 1986-1994. *AIDS*, 10: 903-910.
76. De Leys R., Vanderborcht B., Vanden Haesevelde M., Heyndrickx L., Van Geel A., Wauters C., Bernaerts R., Saman E., Nijs P., Willems B., Taelman H., Van Der Groen G., Piot P., Tersmette T., Huisman J.G., Van Heuverswyn H.(1990). Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central african origin. *J Virol*, 64: 1207-1216.
77. Delgado E., Thomson M.M., Villahermosa M.L., Sierra M., Ocampo M., Miralles C., Rodriguez-Perez R., Diz-Aren J., Ojea-de-Castro R., Losada E., Cuevas M.T., Vazquez de-Parga E., Carmona R., Perez-Alvarez L., Medrano L., Cuevas L., Taboada J.A., Najera R.(2002). Identification of a newly characterized HIV-1 BG intersubtype circulating recombinant form in Galicia, Spain, which exhibits pseudotype-like virion structure. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 29: 536-543.
78. Delwart E.L., Shpaer E.G., Louwagie J., McCuthan F.E., Grez M., Rubsamen-Waigmann H., Mullins J.I.(1993). Genetic relationships determined by a DNA Heteroduplex Mobility Assay: analysis of HIV-1 *env* genes. *Science*, 262: 1257-1261.

79. Deng H., Liu R., Ellmeier W., Choe S., Unutmaz D., Burkhart M., Di Marzio P., Marmon S., Sutton R.E., Hill C.M., Davis C.B., Peiper S.C., Schall T.J., Littman D.R., Landau N.R.(1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*, 381: 661-666.
80. Descamps D., Apatrei C., Collin G., Damond F., Simon F., Brun-Vézinet F.(1998). Naturally occurring decreased susceptibility of HIV-1 subtype G to protease inhibitors [letter]. *AIDS*, 12: 1109-1111.
81. Descamps D., Collin G., Letourneur F., Apatrei C., Damond F., Lousert-Ajaka I., Simon F., Saragosti S., Brun-Vézinet F.(1997). Susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 group O isolates to antiretroviral agents: in vitro phenotypic and genotypic analysis. *J Virol*, 71: 8893-8898.
82. Descamps D., Collin G., Lousert-Ajaka I., Saragosti S., Simon F., Brun-Vézinet F.(1995). HIV-1 group O sensitivity to antiretroviral drugs. *AIDS*, 9: 977-978.
83. De Souza M.P., Harden V.A.(1996). Chemokines and HIV-1 second receptors. *Nature Med*, 2: 1293-1300.
84. Dittmar M.T., Simmons G., Hibbitts S., O'Hare M., Lousiroitchanaku S., Beddows S., Weber J., Clapham P.R., Weiss R.A.(1997). Langerhans cell tropism of human immunodeficiency virus type 1 subtype A through F isolates derived from different transmission groups. *J Virol*, 71: 8008-8013.
85. Dorn J., Masciotra S., Yang C., Downing R., Biryahwaho B., Mastro T.D., Nkengasong J., Pieniazek D., Rayfield M.A., Hu D.J., Lal R.B.(2000). Analysis of genetic variability within the immunodominant epitopes of envelope gp41 from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M and its impact on HIV-1 antibody detection. *J Clin Microbiol*, 38: 773-780.
86. Dowling W.E., Kim B., Mason C.J., Wasunna K.M., Alam U., Elson L., Birx D.L., Robb M.L., McCutchan F.E., Carr J.K.(2002). Forty-one near full-length HIV-1 sequences from Kenya reveal an epidemic of subtype A and A-containing recombinants. *AIDS*, 16: 1809-1820.
87. Dragic T., Litwin V., Allaway G.P., Martin S.R., Huang Y., Nagachima K.A., Cayanan C., Maddon P.J., Koup R.A., Moore J.P., Paxton W.A.(1996). HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-R5. *Nature*, 381: 667-673.

88. Dumonceaux J., Nisole S., Chanel C., Quivet L., Amara A., Baleux F., Briand P., Hazan U.(1998). Spontaneous mutations in the env gene of the human immunodeficiency virus type 1 NDK isolate are associated to with a CD4-independent entry phenotype. *J Virol*, 72: 512-519.
89. Dunne A.L., Crowe S.M.(1997). Comparison of branched DNA and reverse transcriptase polymerase chain reaction for quantifying six different HIV-1 subtypes in plasma. *AIDS*, 11: 126-127.
90. Eberle J., Loussert-Ajaka I., Brust S., Zekeng L., Hauser P.H., Kaptue L., Knapp S., Damond F., Saragosti S., Simon F., Gürtler L.G.(1997). Diversity of the immunodominant epitope of gp41 of HIV-1 subtype O and its validity for antibodies detection. *J Virol Methods*, 67: 85-91.
91. Ellenberger D.L., Pieniazk D., Nkengasong J., Luo C.-C., Devare S., Maurice C., Janini M., Ramos A., Fridlund C., Hu D.L., Coulibaly I.-M., Ekpeni E., Wiktor S.Z., Greenberg A.E., Schochetman G., Rayfield M.A.(1999). Genetic analysis of human immunodeficiency virus in Abidjan, Ivory Coast reveals predominance of HIV type 1 subtype A and introduction of subtype G. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 15: 3-9.
92. Ellenberger D.L., Sullivan P.S., Dorn J., Schable C., Spira T.J., Folks T.M., Lal R.B.(1999). Viral and immunologic examination of human immunodeficiency virus type 1-infected, persistently seronegative persons. *J Infect Dis*, 180: 1033-1042.
93. Enwonwu C.O., Falkler W.A.Jr, Idigbe E.O.,Savage K.O.(1999). Noma (*Cancrum oris*) : questions and answers. *Oral Dis*, 5: 144-149.
94. Eshleman S.H., Becker-Pargola G., Deseyve M., Guay L.A., Mracna M., Fleming T., Cunningham S., Musoke P., Mmiro F., Jackson J.B.(2001). Impact of human immunodeficiency virus type 1 (hiv-1) subtype on women receiving single-dose nevirapine prophylaxis to prevent hiv-1 vertical transmission (hiv network for prevention trials 012 study). *J Infect Dis*, 184: 914-917.
95. Eshleman S.H, Gonzales M.J., Becker-Pergola G., Cunningham S.C., Guay L.A., Jackson J.B., Shafer R.W.(2002). Identification of ugandan HIV type 1 variants with unique patterns of recombination in pol involving subtypes A and D. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 18: 507-511.
96. Falkler W.A.Jr, Enwonwu C.O., Idigbe E.O.(1999). Microbiological understandings

and mysteries of noma (*Cancrum oris*). *Oral Dis*, 5: 150-155.

97. Felsenstein J.(1992). Phylip (Phylogeny Inference Program). 3.5 C ed. Department of genetics, University of Washington, Seattle, Washington.

98. Feng Y., Broder C.C., Kennedy P.E., Berger E.A.(1996). HIV-1 entry cofactor functional cDNA cloning of a seven-transmembrane G protein-coupled receptor. *Science*, 272: 872-877.

99. Flores S.C., Marecki J.C., Harper K.P., Bose S.K., Nelson S.K., McCord J.M.(1993). Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 represses expression of manganese superoxyde dismutase in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 7632-7636.

100. Fankhauser C., Izaurralde E., Adachi Y., Wingfield P., Laemmler U.K.(1991). Specific complex of human immunodeficiency virus type 1 Rev and nucleolar B23 protein : dissociation by the Rev response element. *Mol Cell Biol*, 11: 2567-2575.

101. Francis D.P., Heyward W.L., Popovic V., Orozco-Cronin P., Orelind K., Gee C., Hirsch A., Ippolito T., Luck A., Longhi M., Gulati V., Winslow N., Gurwith M., Sinangil F., Berman P.W.(2003). Candidate HIV/AIDS vaccines: lessons learned from the World's first phase III efficacy trials. *AIDS*, 17: 147-156.

102. Fritz C.C., Zapp M.L., Green M.R.(1995). A human nucleoporin-like protein that specifically interacts with HIV Rev. *Nature*, 376: 530.

103. Garcia J.A., Gaynor R.B.(1994). The human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat and it's role in gene expression. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 49: 157-196.

104. Gao F., Bailes E., Robertson D.L., Chen Y., Rodenburg C.M., Michael C.F., Cummins B., Arthur I.O., Peeters M., Shaw G., Sharp P.M.(1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*, 397: 436-440.

105. Gao F., Robertson D.L., Carruthers C.D., Li Y., Bailes E., Kostrikis L.G., Salminen M.O., Bibollet-Ruche F., Peeters M., Ho D.D., Shaw G.M., Sharp P.M., Hahn B.(1998). An isolate of human immunodeficiency virus type 1 originally classified as subtype I represents a complex mosaic comprising three different group M subtypes (A, G, and I). *J Virol*, 72: 10234-10241.

106. Gao F., Robertson D.L., Morrison S.G., Hui H., Craig S., Drecker J., Fultz P.N.,

- Girard M., Shaw J.M., Hahn B.H., Sharp P.M.(1996).** The heterosexual human immunodeficiency virus type 1 epidemic in Thailand is caused by an intersubtype (A/E) recombinant of african origin. *J Virol*, 70: 7013-7029.
107. **Gao F., Vidal N., Li Y., Trask S.A., Chen Y., Kostrikis L.G., Ho D.D., Kim J., Oh M-D., Choe K., Salminen M., Robertson D.L., Shaw G.M., Hahn B., Peeters M. (2001).** Evidence of two distinct subsubtypes within the HIV-1 subtype A radiation. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 17: 675-688.
108. **Gao F., Yue L., Robertson D.L., Hill S.C., Hui H., Biggar R.J., Neequaye A.E., Whelan T.M., Ho D.D., Shaw G.M., Sharp P.M., Hahn B.H.(1994).** Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. *J Virol*, 68: 7433-7447.
109. **Garcia J.V., Alfonso J., Miller A.D.(1993).** The negative effect of human immunodeficiency virus type 1 Nef on cell surface CD4 expression is not species specific and requires the cytoplasmic domain of CD4. *J Virol*, 67:1511.
110. **Gaschen B., Taylor J., Yusim K., Foley B., Gao F., Lang D., Novitsky V., Haynes B., Hahn B.H., Bhattacharya T., Korber B.(2002).** Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection. *Science*, 296: 2354-2360.
111. **Geijtenbeek T.B., Kwon D.S., Torensma R., Van Vliet S.J., Van Duijnhoven G.C., Middel J., Cornelissen I.L., Nottet H.S., Kewalramani V.N., Littman D.R., Figdor C.G., Van Kooyk Y.(2000).** DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1 binding protein that enhances trans-infection of T6cells. *Cell*, 100: 587-597.
112. **Girard M.(2002).** Le long chemin du vaccin contre le sida. *Annales de l'Institut Pasteur/Actualités*, 12: 105-117.
113. **Girard P.-M., Katlama C., Pialoux G.(2001).** VIH, *Doin Eds*, pp 35-39.
114. **Gisselquist D., Rothenberg R., Potterat J., Drucker E.(2002).** HIV infections in Sub-Saharan Africa not explained by sexual or vertical transmission. *Int J STD AIDS*, 13: 657-666.
115. **Gluckman J-C.(1996).** Mécanismes immunopathologiques de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine. *Ann Med Int*, 17: 313-320.
116. **Goedert J.J., Duelliege A.M., Ames C.I., Felton S., Biggar R.J.(1991).** High risk of

infection with human immunodeficiency virus type 1 for first-born vaginally delivered twins. *Lancet* ii:1471-1475.

117. **Goncalves J., Jallepalli P., Gabuzda D.H.(1994).** Subcellular localization of the Vif protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 68: 704.

118. **Gottlieb M.S., Schroff R., Schanker H.M., Weisman J.D., Fan P.T., Wolf R.A., Saxon A.(1981).** *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med*, 305: 1425-1431.

119. **Gougeon M.-L.(2001).** Apoptose et virus: les voies de signalisation de la mort cellulaire et les stratégies virales mises en jeu pour moduler ces voies. *Virologie*, 5: 347-360.

120. **Gould K., Brivan L., Dryjansky J.(1996).** HIV-1 group O infection in the USA. *Lancet*, 348: 680-681.

121. **Goulder P.J., Walker B.D.(2002).** HIV-1 superinfection - a word of caution. *N Engl J Med*, 347: 756-758.

122. **Gozlan J., Mackiewicz V.(2000).** La protéine Vpr du VIH-1 et le cycle cellulaire. *Virologie*, 4: 21-27.

123. **Gürtler L.G, Hauser P.H., Eberle J., Von Brunn A., Knapp S., Zekeng L., Tsague J.M., Kaptue L.(1994).** A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP5180) from Cameroon. *J Virol*, 68: 1581-1585.

124. **Hahn B.H., Shaw G.M., De Cock K.M., Sharp P.M.(2000).** AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science*, 287: 607-614.

125. **Halary F., Amara A., Lortat-Jacob H., Messerle M., Delaunay T., Houles C., Fieschi F., Arenzana-Seisdedos F., Moreau J.F., Dechanet-Merville J.(2002).** Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity*, 17: 653-664.

126. **Hampfl H., Sawitzky D., Stoffler-Meilike M., Groh A., Schmitt M., Eberle J., Gürtler L.(1995).** First case of HIV-1 subtype O infection in Germany. *Infection*, 23: 369-370.

127. **Harouse J., Bhat S., Spitalnik S.L., Laughlin M.A., Stefano K., Siberberg D.H., Gonzalez-Scarano F.(1991).** Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell-lines by antibodies

against galactosyl ceramide. *Science*, 253: 320-323.

128. Harzic M., Sereni D.(1999). Pathogénie de la primo-infection à VIH. *Médecine Thérapeutique*, 5 (hors série1): 32-37.

129. Haynes B.F., Pantaleo G., Fauci A.S.(1996). Toward an understanding of the correlates of protective immunity to HIV infection. *Science*, 271: 324-328.

130. Hazuda D.J., Felock P., Witmer M., Wolfe A., Stillmock K., Grobler J.A., Espeseth A., Gabryelski L., Schleif W., Blau C., Miller M.D.(2000). Inhibitors of strands transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science*, 287: 646-650.

131. Heyndrickx L., Alary M., Janssens W., Davo N., Van Der Groen G.(1996). HIV-1 group O and group M dual infection in Benin. *Lancet*, 347: 902-903.

132. Heyndrickx L., Janssens W., Alary M., Fransen K., Vereecken K., Copens S., Willems B., Davo N., Guèdèmè A., Baganizi E., Joly J., Van Der Groen G.(1996). Genetic variability of HIV type 1 in Bénin. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 12: 1495-1497.

133. Heyndrickx L., Janssens W., Zekeng L., Musonda R., Anagonou S., Van der Auwera G., Copens S., Vereecken K., De Witte K., Van Rampelbergh R., Kahindo M., Morison L., McCutchan F.E., Carr J.K., Albert J., Essex M., Goudsmit J., Asjo B., Salminen M., Buve A., Van Der Groen G.(2000). Simplified strategy for detection of recombinant human immunodeficiency virus type 1 group M isolates by gag/env heteroduplex mobility assay. Study Group on Heterogeneity of HIV Epidemics in African Cities. *J Virol*, 74: 363-370.

134. Ho D.D.(1995). Time to hit HIV, early and hard. *N Engl J Med*, 333: 450-451.

135. Ho D.D., Huang Y.(2002). The HIV-1 vaccine race. *Cell*, 110: 135-138.

136. Ho D.D., Neumann A.U., Perelson A.S., Wen C., Leonord J.M., Markowitz M.(1995). Rapid turn over of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV infection. *Nature*, 373: 123-126.

137. Ho W.Z., Liroy J., Song L., Cutilli J.R., Polin R.A., Douglas S.D.(1992). Infection of cord blood monocyte-derived macrophages with human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 66: 573-579.

138. Hoelscher M., Dowling W.E., Sanders-Buell E., Carr J.K., Harris M.E., Thomschke A., Robb M.I., Birx D.L., McCutchan F.E.(2002). Detection of HIV-1

- subtypes, recombinants, and dual infections in East Africa by a Multi-region Hybridization Assay. *AIDS*, 16: 2055-2064.
139. Howard T.M., Racheed S.(1996). Genomic structure and nucleotide sequence analysis of a new Hiv type 1 subtype A strain from Nigeria. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 12: 1413-1425.
140. Hu D., Dondero T., Rayfield M., George J.R., Schochetman G., Jaffe S.W., Luo C.C., Kalish M.L., Weniger B.G., Pau C.P., Schable C.A., Curran J.W.(1996). The emerging diversity of HIV. The importance of global surveillance for diagnostics, research and prevention. *JAMA*, 275: 210-216.
141. Hu W.S., Temin H.M.(1990). Retroviral recombination and reverse transcription. *Science*, 250: 1227-1233.
142. Hunt J.C., Golden A.M., Lund J.K., Gürtler L.G., Zekeng L., Obiang J., Kaptue L., Hampl H., Vallari A., Devare S.G.(1997). Envelope sequence variability and serological characterization of HIV type1 group O isolates from Equatorial Guinea. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 13: 995-1005.
143. **International HIV Treatment Access Coalition (2002)**. A commitment to action for expanded access to HIV/AIDS treatment
(http://www.who.int/hiv/pub/arv/who_hiv_2002_24.pdf)
144. Ishikawa K., Janssens W., Brandful J., Heyndrickx L., Takebe Y., Ampofo W., Sata T., Yamazaki S., Osei-Kwasi M., Yamamoto N., Koyanagi Y., Van Der Groen G., Kurata T.(1996). Genetic and phylogenetic analysis of HIV type 1 env subtypes in Ghana, West Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 12: 1575-1578.
145. Ishikawa K., Janssens W., Banor J.S., Shinno T., Piedade J., Sata T., Ampofo W.K., Brandful J.A., Koyanagi Y., Yamamoto N., Canas-Ferreira W.F., Adu-Sarkodie Y., Kurata T.(2001). Genetic analysis of HIV type 2 from Ghana and Guinea-Bissau, West Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 17: 1661-1663.
146. Janini L.M., Tanuri A., Schechter M., Peralta J.M., Vicente A.C., Dela Torre N., Pieniazek N.J., Luo C.C., Ramos A., Soriano V., Schochetman G., Rayfield M.A., Pieniazek D.(1998). Horizontal and vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1 dual infections caused by viruses of subtypes B and C. *J Infect Dis*, 177: 227-231.
147. Janssens W., Nkengasong J.N., Heyndrickx L., Fransen K., Ndumbe P.M.,

Delaporte E., Peeters M., Perret J-L., Ndoumou A., Atende C., Piot P., Van Der Groen G.(1994). Further evidence of the presence of genetically aberrant HIV-1 strains in Cameroon and Gabon. *AIDS*, 8: 1012-1013.

148. Janssens W., Salminen M.O., Laukkanen T., Heyndrickx L., Van Der Auwera G., Colebunders R., McCutchan F.E., Van Der Groen G.(2000). Near full-length genome analysis of HIV type 1 CRF02-AG subtype C and CRF02-AG subtype G recombinants. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 16: 1183-1189.

149. Janssens W., Nkengasong J., Heyndrickx L., Van Der Auwera G., Vereecken K., Coppens S., Willems B., Beirnaert E., Franssen K., Peeters M., Van Der Groen G.(1999). Inpatient variability of HIV type 1 group O ANT70 during a 10-year follow-up. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 15: 1325-1332.

150. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (2002). AIDS epidemic update-December 2002 (http://www.unaids.org/worldaidsday/2002/press/update/epiupdate_en.pdf)

151. Jonassen T.O., Grinde B., Asjo B., Hasle G., Hungnes O.(2000). Intersubtype recombinant HIV type 1 involving HIV-MAL-like and subtype H-like sequence in four norwegian cases. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 16: 49-58.

152. Jonassen T., Stene-Johansen K., Berg E.S., Hungnes O., Lindboe C.F., Froland S.S., Grinde B.(1997). Sequence analysis of HIV-1 group O from norwegian patients infected in 1960s. *Virology*, 231: 43-47.

153. Jost S., Bernard M.C., Kaiser L., Yerly S., Hirschel B., Samri A., Autran B., Goh L.E., Perrin L.(2002). A patient with HIV superinfection. *N Engl J Med*, 347: 731-736.

154. Juber-Maurin V., Saragosti S., Perret J.-L., Mpoudi E., Esu-Williams E., Mulanga C., Liegeois F., Ekwilanga M., Delaporte E., Peeters M.(1999). Genetic characterization of the *nef* gene from human immunodeficiency virus type 1 group M strains representing genetic subtypes A, B, C, E, F, G, and H. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 15: 23-32.

155. Kaleebu P., French N., Mahe C., Yirrell D., Watera C., Lyagoba F., Nakiyingi J., Rutebemberwa A., Morgan D., Weber J., Gilks C., Whitworth J.(2002). Effect of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 envelope subtypes A and D on disease progression in a large cohort of HIV-1-positive persons in Uganda. *J Infect Dis*, 185: 1244-1250.

156. Kaleebu P., Ross A., Morgan D., Yirrel D., Oram J., Rutebemberwa A., Lyagoba F., Hamilton L., Biryahwaho B., Whitworth J.(2001). Relationship between HIV-1 env

- subtypes A and D and disease progression in a rural cohort Ugandan cohort. *AIDS*, 15: 293-299.
157. Kaleebu P., Whitworth J., Hamilton L., Rutebemberwa A., Lyagoba F., Morgan D., Duffield M., Biryahwaho B., Magambo B., Oram J.(2000). Molecular epidemiology of HIV type 1 in rural community in Southwest Uganda. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 16: 393-401.
158. Kamine J., Subramanian T., Chinnadurai G.(1993). Activation of a heterologous promoter by human immunodeficiency virus type 1 Tat requires Sp1 and is distinct from the mode of activation by acidic transcriptional activators. *J Virol*, 67: 6828-6834.
159. Kanki P.(1999). Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2). *AIDS Rev*, 1:101-108.
160. Kanki P.J., Hamel D.J., Sankalé J.L., Hsieh C-C, Thior I., Barin F., Woodcck S.A., Gueye-Ndiaye A., Zhang E., Montano M.,Siby T., Marlink R., Ndoye I., Essex M., Mboup S.(1999). Human immunodeficiency virus type 1 subtypes differ in disease progression. *J Infect Dis*, 179: 68-73.
161. Kanki P., Mboup S., Marlink R., Travers K., Hsieh C-C., Gueye A., Boye C., Sankale J-L., Donnelly C., Leisenring W., Siby T., Thior I., Dia M., Gueye E-H., Ndoye I., Essex M.(1992). Prevalence and risk determinants of human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) and human immunodeficiency type 1 (HIV-1) in west african female prostitutes. *Am J Epidemiol*, 136: 895-907.
162. Kanki P., Travers K., Mboup S., Hsieh C.C., Marlink R.G., Gueye-Ndiaye A., Siby T., Thior I., Hernandez-Avila M., Sankalé J.L., et al.(1994). Slower heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1. *Lancet*, 343: 943-946.
163. Kaoper P., Kaiser R., Oldenburg J., Brackmann H.H., Matz B., Schneweis K.E. (1994). Parallel evolution in the V3 region of HIV-1 after infection of hemophiliacs from homogenous source. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 10: 1669-1678.
164. Kaufmann S.H., Schaible U.E.(2003). A dangerous liaison between two major killers: Mycobacterium tuberculosis and HIV target dendritic cells through DC-SIGN. *J Exp Med*, 197: 1-5.
165. Kaul R., Rowland-Jones S.L., Kimani J., Dong T., Yang H-B., Kiama P., Rostron T., Njagi E., Bwayo J.J., MacDonald K.S., McMichael A.J., Plummer F.A.(2001). Late

- seroconversion in HIV-resistant Nairobi prostitutes despite pre-existing HIV-specific CD8+ responses. *J Clin Invest*, 107: 341-349.
166. **Kellam P., Larder B.A.(1994).** Recombinant Virus Assay: a rapid phenotypic assay for assessment of drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 38: 23-30.
167. **Kido H., Kamoshita K., Fukutomi A., Katunuma N. (1993).** Processing protease for gp160 human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein precursor in human T4 lymphocytes. Purification and characterization. *J Biol Chem*, 268: 13406.
168. **Kijak G.H., Rubio A.E., Quarleri J.F., Salomon H.(2001).** HIV type 1 genetic diversity is a major obstacle for antiretroviral drug resistance hybridization-based assays. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 17: 1415-1421.
169. **Kimura M.(1980).** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. *J Mol Evol*, 16: 111-120.
170. **Kokkotou E., Sankalé J.L., Mani I., Guèye-Ndiaye A., Schwartz D., Essex M.E., Mboup S., Kanki P.J.(2000).** In vitro correlates of HIV-2-mediated HIV-1 protection. *PNAS*, 97: 6797-6802.
171. **Kondo E., Mammano F., Cohen E.A., Gottlinger H.G.(1995).** The p6gag domain of human immunodeficiency virus type 1 is sufficient for the incorporation of Vpr into heterologous viral particles. *J Virol*, 69: 2759.
172. **Koop R.A.(1994).** Virus escape from CTL recognition. *J Exp Med*, 180: 779-782.
173. **Korber B.T., Gaschen B., Yusim K., Thakallapally R., Kesmir C., Detours V.(2001).** Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *Br Med Bull*, 58: 19-42.
174. **Korber B.T., Mac Innes K., Smith R.F., Myers G.(1994).** Mutational trends in V3 loop protein sequences observed in different genetic lineages of HIV-1. *J Virol*, 68: 6730-6744.
175. **Korber B.T., Muldoon M., Theiler J., Gao F., Gupta R., Lapedes A., Hahn B.H., Wolinsky S., Bhattacharya T.(2000).** Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science*, 288: 1789-1796.
176. **Kostense S., Oggs G.S., Manting E.H., Gillepsie G., Joling J., Vandenberghe K.,**

Veenhof E.Z., van Baarle D., Jurriaans S., Klein M.R., Miedema F.(2001). High viral burden in the presence of major HIV-specific CD8(+) T cell expansions: evidence of impaired CTL effector function. *Eur J Immunol*, 31: 677-686.

177. Kostrikis L.G., Bagdades E., Cao Y., Zhang L., Dimitriou D., Ho D.D.(1995). Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 strains from patients in Cyprus : identification of a new subtype designed subtype I. *J Virol*, 69: 6122-6130.

178. Kostrikis L.G., Shin S., Ho D.D.(1998). Genotyping HIV-1 and HCV strains by a combinatorial DNA melting assay. *Mol Med*, 4: 443-453.

179. Koulinska IN, Ndung'u T, Mwakagile D., Msamanga G., Kagoma G., Fawzi W., Essex M., Renjifo B.(2001). A new human immunodeficiency virus type 1 circulating recombinant form from Tanzania, *AIDS Res Hum Retroviruses*, 17: 423-431.

180. Kumar P., Hui H.X., Kappes J.C., Haggarty B.S., Hoxie J.A., Arya S.K., Shaw G.M., Hahn B.H.(1990). Molecular characterization of an attenuated human immunodeficiency virus type 2 isolate. *J Virol*, 64: 890-901.

181. Kunanusont C., Foy H., Kreiss J.K., Rerks-Ngarm S., Phanuphak P., Raktham S., Pau C-P, Young N.L.(1995). HIV-1 subtypes and male-to-female transmission in Thailand. *Lancet*, 345: 1078-1083.

182. Lasky M., Perret J.L., Peeters M., Bibollet-Ruche F., Liegeois F., Patrel D., Molinier S., Gras C., Delaporte E.(1997). Presence of multiple non-B subtypes and divergent subtypes B strains of HIV-1 in individuals infected after overseas deployment. *AIDS*, 11: 43-51.

183. Laukkanen T., Carr J.K., Janssens W., Liitsola K., Gotte D., McCutchan F.E., Op de Coul E., Cornelissen M., Heyndrickx L., Van Der Groen G., Salminen M.O.(2000). Virtually full-length subtype F and F/D recombinant HIV-1 from Africa and South America. *Virology*, 269: 95-104.

184. Laurent C., Bourgeois A., Faye M.A., Mougnotou R., Seydi M., Gueye M., Liegeois F., Kane C.T., Butel C., Mbuagbaw J., Zekeng L., Mboup S., Mpoudi-Ngole E., Peeters M., Delaporte E.(2002). No difference in clinical progression between patients infected with the predominant human immunodeficiency virus type 1 circulating recombinant form (CRF) 02_AG strain and patients not infected with CFR02_AG, in Western and West-Central Africa: a four-year prospective multicenter study. *J Infect Dis*,

186: 486-492.

185. **Laurent C., Delaporte E.**(2001). Epidemiology of HIV infection Sub-saharan Africa. *AIDS Rev*, 3 :59-66.

186. **Leano P.S., Kageyama S., Espantaleon A., Maniar J., Iwasaki M., Saple D., Yoshihara N., Kurimura T., Agdamag D.M.**(2003). Introduction of human immunodeficiency virus type 2 infection in the Philippines. *J Clin Microbiology*, 41: 516-518.

187. **Lee C.N., Chen M.Y., Lin H.S., Lee M.C., Luo C.C., Twu S.J., Lin R.Y., Chuang C.Y.**(1998). HIV type 1 env subtype A variants in Taiwan. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 14 : 807-809.

188. **Levy D.N., Refaeli Y., Mac Gregor R.R., Weiner D.B.**(1994). Serum Vpr regulates productive infection and latency of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 10873.

189. **Li C.J., Friedman D.J., Wang C., Metelev V., Pardee A.B.**(1995). Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science*, 268: 429-431.

190. **Li C., Lai C.F., Sigman D.S., Gaynor R.B.**(1991). Cloning of a cellular factor, interleukin binding factor that binds to NFAT-like motifs in the human immunodeficiency virus long terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 7739-7743.

191. **Liitsola K., Tashkinova I., Laukkanen T., Korovina G., Smolskaja T., Momot O., Masbkillayson N., Chaplinskias S., Brummer-Korvenkontio H., Vanhatalo J., Leinikki P., Salminen M.O.**(1998). HIV-1 genetic subtype A/B recombinant strain causing an explosive epidemic in injecting drug users in Kaliningrad. *AIDS*, 12: 1907-1919.

192. **Lin G., Simmons G., Pohlmann S., Baribaud F., Ni H., Leslie G.J., Haggarty B.S., Bates P., Weissman D., Hoxie J.A., Doms R.W.**(2003). Differential N-linked glycosylation of human immunodeficiency virus and Ebola virus envelope glycoproteins modulates interactions with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol*, 77: 1337-1346.

193. **Lochelt M., Yu S.F., Linial M.L., Flugel R.M.**(1995). The human foamy virus internal promoter is required for efficient gene expression and infectivity. *Virology*, 206: 601.

194. **Loussert-Ajaka I., Chaix M-L., Korber B., Letourneur F., Gomas E., Allen E., Ly**

- T-D., Brun-Vezinet F., Simon F., Saragosti S.(1995a).** Variability of human immunodeficiency virus type 1 group O strains isolated from Cameroonian patients living in France. *J Virol*, 69: 5640-5649.
- 195. Loussert-Ajaka I., Descamp D., Simon F., Brun-Vezinet F., Ekwilanga M., Saragosti S.(1995b).** Genetic diversity and HIV detection by polymerase chain reaction (letter). *Lancet*, 346: 912-913.
- 196. Loussert-Ajaka I., Ly T.D., Chaix M-L., Ingrand D., Saragosti S., Courouce A.M., Brun-Vezinet F., Simon F.(1994).** HIV-1/HIV-2 seronegativity in HIV-1 subtype O infected patients. *Lancet*, 343: 1393-1394.
- 197. Loussert-Ajaka I., Menu E., Apatrei C., Peeters M., Damont F., Mauclère P., Eberle J., Brengues C., Saragosti S., Barré-Sinoussi F., Brun-Vézinet F., Simon F.(1998).** HIV type 1 diversity and the reliability of the heteroduplex mobility assay. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 14: 877-883.
- 198. Lukashov V.V., Huismans R., Rakhmanova A.G., Lisitsina Z.N., Akhtyrskaya N.A., Vlasov N.N., Melnick O.B., Goudsmit J.(1999).** Circulation of subtype A and gagA/envB recombinant HIV type 1 strains among injecting drug users in St. Petersburg, Russia, correlates with geographical origin of infections. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 15: 1577-1583.
- 199. Luo C.C., Downing R., Dela Torre N., Baggs J., Hu D.J., Respass R.A., Candal D., Carr L., George J.R., Dondero T.J., Biryahwaho B., Rayfield M.A.(1998).** The development and evaluation of probe hybridization method for subtyping HIV infection in Uganda. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 14: 691-694.
- 200. Ly T.D., Martin L., Daghfal D., Sandridge A., West D., Bristow R., Chalouas L., Qiu X., Lou S.C., Hunt J.C., Schochetman G., Devare S.G.(2001).** Seven human immunodeficiency virus (HIV) antigen-antibody combination assays: evaluation of HIV seroconversion sensitivity and subtype detection. *J Clin Microbiol*, 39: 3122-3128.
- 201. Mahalingam S., Khan S.A., Jabbar M.A., Monken C.E., Collman R.G., Srinivasan A.(1995).** Identification of residues in the N-terminal acidic domain of the HIV-1 Vpr essential for virion incorporation. *Virology*, 207: 297.
- 202. Maldarelli F., Chen M.Y., Willey R.L., Strebel K.(1993).** Human immunodeficiency virus type 1 Vpu is an oligomeric type I integral membrane protein. *J Virol*, 67: 5056.

203. Mani I., Gilbert P., Sankalé J.L., Eisen G., Mboup S., Kanki P.(2002). Inpatient diversity and its correlation with viral setpoint in human immunodeficiency virus type 1 CRF02-AG-IbNG infection. *J Virol*, 76: 10745-10755.
204. Marlink R., Kanki P., Thior I., Travers K., Eisen G., Siby T., Traore I., Hsieh C-C., Dia M., Gueye E-H., Hellinger J., Gueye-Ndiaye A., Sankale J-L., Ndoeye I., Mboup S., Essex M.(1994). Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science*, 265: 1587-1590.
205. Marx P.A., Li Y., Lerche N.W., Sutjipto S., Gettie A., Yee J.A., Brotman B.H., Prince A.M., Hanson A., Webster R.G., et al.(1991). Isolation of a simian immunodeficiency virus related to human immunodeficiency virus type 2 from a west african pet sooty mangabey. *J Virol*, 65: 4480-4485.
206. Mas A., Quinones-Mateu M.E., Soriano V., Domingo E.(1996). Env gene characterization of the first HIV-1 group O spanish isolate. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 12: 1647-1649.
207. Mastro T.D., De Vincenzi I.(1996). Probabilities of sexual HIV-1 transmission. *AIDS*, 10: S75-S82.
208. Matheron S., Mendoza-Sassi G., Simon F., Olivares R., Coulaud J.P., Brun-Vezinet F.(1997). HIV-1 and HIV-2 AIDS in african patients living in Paris. *AIDS*, 11: 934-936.
209. Maucière P., Damond F., Apatrei C., Loussert-Ajaka I., Souquière S., Buzelay L., Dalbon P., Jolivet M., Lobé M.M., Brun-Vézinet F., Simon F., Barin F.(1997). Synthetic peptide ELISAs for detection of and discrimination between group M and group O HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 13: 987-993.
210. Maucière P., Loussert-Ajaka I., Damond F., Fagot P., Souquières S., Lobe M.M., Keou F-X.M., Barré-Sinoussi F., Saragosti S., Brun-Vezinet F., Simon F.(1997). Serological and virological characterization of HIV-1 group O infection in Cameroon. *AIDS*, 11: 445-453.
211. Mayaux M.J., Blanche S., Rouzioux C., Le Chenadec S., Chambrin V., Fiction G., Allemon M.C., Vilmer E., Ciraru-Vigneron N., Tricoire J., Guillor F., Courpotin C., and Group a.t.f.p.h.i.s.(1995). Maternal factors associated with perinatal HIV-1 transmission: the french cohort study. 7 years of the followings observation. *J Acquir*

Immune Defic Syndr, 8: 188-194.

212. **McCutchan F.E.(2000)**. Understanding the genetic diversity of HIV-1. *AIDS*, 14 (suppl 3): S31-S44.
213. **McGann K.A., Collman A., Kolson D.L., Gonzalez-Scarano F., Coukos G., Coutifaris C., Strauss J.F., Natbanson N.(1994)**. Human immunodeficiency virus type 1 causes productive infection of macrophage primary placental cell cultures. *J Infect Dis*, 169: 746-753.
214. **McNearney T., Hornickova Z., Markham R., Birdwell A., Arens M., Saah A., Ratner L.(1992)**. Relationship of human immunodeficiency virus type 1 sequence heterogeneity to stage of disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 10247-10251.
215. **Meier U.C., Klenerman P., Griffin P., James W., Koppe B., Larder B., McMichael A., Phillips R.(1995)**. Cytotoxic T lymphocyte lysis inhibited by viable HIV mutants. *Science*, 270: 1360-1362.
216. **Miller M.D., Warmerdam M.T., Page K.A., Feinberg M.B., Greene W.C.(1995)**. Expression of the human immunodeficiency virus type 1(HIV-1) nef gene during HIV-1 production increases progeny particle infectivity independently of gp160 or viral entry. *J Virol*, 69: 579-584.
217. **Molina J.-M., Yéni P.(1999)**. Comment utiliser les antirétroviraux disponibles. *Médecine Thérapeutique*, 5 (hors série1): 58-63.
218. **Montavon C., Bibollet-Ruche F., Robertson D., Koumare B., Mulanga C., Esu-Williams E., Touré C., Mboup S., Saman E., Delaporte E., Peeters M.(1999)**. The identification of a complex A/G/I/J recombinant HIV type 1 virus in various west african countries. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 15: 1707-1712.
219. **Montavon C., Touré-Kane C., Liegeois F., Mpoudi E., Bourgeois A., Vergne L., Perret J-L., Boumah A., Saman E., Mboup S., Delaporte E., Peeters M.(2000)**. Most *env* and *gag* subtype A HIV-1 viruses circulating in West and West Central Africa are similar to the prototype AG recombinant virus IbNG. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 23: 363-374.
220. **Montavon C., Touré-Kane C., Nkengasong J.N., Vergne L., Hertogs K., Mboup S., Delaporte E., Peeters M.(2002)**. CRF06_cpx : a new circulating recombinant form of HIV-1 in West Africa involving subtypes A, G, K, and J. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 15: 522-530.

221. Montavon C., Vergne L., Bourgeois A., Mpoudi-Ngole E., Malonga-Mouellet G., Butel C., Touré-Kane C., Delaporte E., Peeters M.(2002). Identification of a new circulating recombinant form of HIV type 1, CRF11_cpx, involving subtypes A, G, J, and CRF01_AE, in Central Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 18: 231-236.
222. Morgado M.G., Guimaraes M.L., Gripp C.B., Costa C.I., Neves I.Jr, Veloso V.G., Linhares-Carvalho M.I., Castello-Branco L.R., Bastos F.I., Kuiken C., Castilho E.A., Galvao-Castro B., Bongertz V.(1998). Molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil: high prevalence of HIV-1 subtype B and identification of an HIV-1 subtype D infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Evandro Chagas Hospital AIDS Clinical Research Group. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 18: 488-494.
223. Morison L., Weiss H.A., Buve A., Carael M., Abega S.C., Kaona F., Kanhonou L., Chege J., Hayes R.J., Study Group on Heterogeneity of HIV Epidemics in Africans Cities.(2001). Commercial sex and the spread of HIV in four cities in sub-Saharan Africa. *AIDS*, 15 Suppl 4: S61-S69.
224. Mulaaga-Kabeya C., Esu-Williams E., Enu E., Peeters M., Delaporte E.(1996). Evidence for HIV-1 group O infection in Nigeria (letter). *Lancet*, 346: 308.
225. Murphy E., Korber B., Georges-Courbot M.C., You B., Pinter A., Cook D., Kieny M.P., Georges A., Mathiot C., Barré-Sinoussi F., et al (1993). Diversity of V3 region sequences of human immunodeficiency viruses type 1 from Central Africa Republic. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 9: 997-1006.
226. Nasioulas G., Paraskevis D., Magiorkinis E., Theodoridou M., Hatzakis A.(1999). Molecular analysis of the full-length genome of HIV type 1 subtype I: evidence of A/G/I recombination. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 15: 745-758.
227. Nath S., Jovic G.(1998). *Cancerum oris*: management, incidence and implications of human immunodeficiency virus in Zambia. *Plast Reconstr Surg*, 102: 350-357.
228. Newell M.-L.(2000). Vertical transmission of HIV-1 infection. *Trans Roy Soc Trop Med Hygiene*, 94: 1-2.
229. Nkengasong J.N., Luo C.C., Abouya L., Pieniazek D., Maurice C., Sassan-Morokro M., Ellenberger D., Hu D.J., Pau C.-P., Dobbs T., Respess R., Coulibaly I.-M., Wiktor S.Z., Greeberg A.E., Rayfield M.(2000). Distribution of HIV-1 subtypes among HIV-seropositive patients in the interior of Côte d'Ivoire. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 23:

430-436.

230. Nkengasong J.N., Janssens W., Heyndrickx L., Fransen K., Ndumbe P.M., Motte J., Leonaers A., Ngolle M., Ayuk J., Piot P., *et al.* (1994). Genotypic subtypes of HIV-1 in Cameroon. *AIDS*, 8: 1405-1412.

231. Nowak M.A., May R.M., Phillips R.E., Rowland-Jones S., Lalloo D.G., McAdam S., Klenerman P., Koppe B., Sigmund K., Bangham C.R.M. (1995). Antigenic oscillations and shifting immunodominance in HIV-1 infections. *Nature*, 375: 606-611.

232. Nyambi P.N., Nkengasong J., Peeters M., Simon F., Eberle J., Janssens W., Fransen K., Willems B., Vereecken K., Heyndrickx L., Piot P., Van Der Groen G. (1995). Reduced capacity of antibodies from patients infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group O to neutralize primary isolates of HIV-1 group M viruses. *J Infect Dis*, 172: 1228-1237.

233. Oelrichs R.B., Workman C., Laukkanen T., McCutchan F.E., Deacon N.J. (1998). A novel subtype A/G/J recombinant full-length HIV type 1 genome from Burkina Faso. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 14: 1495-1500.

234. Ohshiro Y., Murakami T., Matsuda K., Nishioka K., Yoshida K., Yamamoto N. (1996). Role of cell surface glycoaminoglycans of human T cells in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection. *Microbiol Immunol*, 40: 827-835.

235. Organisation Mondiale de la Santé (1997). *Cancrum oris* network action. *Noma Contact-OMS*, Genève, Suisse, 1: 1-8.

236. Ouédraogo-Traoré R., Montavon C., Sanou T., Vidal N., Sangaré L., Sanou I., Soudré R., Mboup S., Delaporte E., Peeters M. (2003). CRF06_cpx plays a major role in the AIDS epidemic in Burkina Faso and represents 50% of infections in AIDS patients in Ouagadougou, the capital city. *AIDS*, 17: 441-442.

237. Pantaleo G., Menzo S., Vaccarezza M., Graziosi C., Cohen O.J., Demarest J.F., Montefiori D., Orenstein J.M., Fox C., Schrager L.K., Margolick J.B., Buchbinder S., Giorgi J.V., Fauci A.S. (1995). Studies in subjects with long term non-progressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*, 332: 209-216.

238. Paraskevis D., Magiorkinis M., Papanizos V., Pavlakis G.N., Hatzakis A. (2000). Molecular characterization of a recombinant HIV type 1 isolate (A/G/E/?): unidentified regions may be derived from parental subtype E sequences, *AIDS Res Hum Retroviruses*, 16:

845-855.

239. Parekh B., Phillips S., Granade T.C., Baggs J., Hu D.J., Respass R.(1999). Impact of HIV type 1 subtype variation on viral RNA quantitation. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 15: 133-142.
240. Pau C.P., Lee-Thomas S., Auwenit W., George J.R., Ou C.Y., Parek B.S., Granade T.C., Holloman D.L., Phillips S., Schochetman G.(1993). High specific V3 peptide enzyme immunoassay for serotyping HIV-1 specimens from Thailand. *AIDS*, 7: 337-340.
241. Paul W.E.(1995). Can the immune response control HIV infection? *Cell*, 82: 177-182.
242. Pedroza -Martins L., Chenciner N., Wain-Hobson S.(1992). Complex inpatient sequence variation in the V1 and the V2 hypervariable regions of the HIV-1 gp120 envelope sequence. *Virology*, 19: 837-845.
243. Peeters M.(2000). Recombinant HIV sequences: their role in the global epidemic. In: *Human Retroviruses and AIDS 2000: A Compilation and analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences*. Edited by Kuiken CL, Foey B, Hahn B, Korber B, McCutchan F, Marx PA, Mellors JW, Mullins JI, Sodroski J, and Wolinsky S. Published by Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, pp. 39-54.
244. Peeters M. (2001). The genetic variability of HIV-1 and its implications. *Transfus Clin Biol*, 8 : 222-225.
245. Peeters M., Courgnaud V., Abela B.(2001). Genetic diversity of lentiviruses in non-human primates. *AIDS Rev*, 3: 3-10.
246. Peeters M., Courgneaud V., Abela B., Auzel P., Pourrut X., Bibollet-Ruche F., et al.(2002). Risk to human health from a plethora of simian immunodeficiency viruses in primate bushmeat. *Emerg Inf Dis*, 8: 451-457.
247. Peeters M., Esu-Williams E., Vergne L., Montavon C., Mulanga-Kabeya C., Harry T., Ibiro A., Lesage D., Patrel D., Delaporte E.(2000). Predominance of subtype A and G HIV type 1 in Nigeria, with geographical differences in their distribution. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 16: 315-325.
248. Peeters M., Gaye A., Mboup S., Badombena W., Bassabi K., Prince-David M., Develoux M., Liegeois F., Van Der Groen G., Saman E., Delaporte E.(1996). Presence of HIV-1 group O infection in West Africa. *AIDS*, 10: 343-344.

249. Peeters M., Koumare B., Mulanga C., Brengues C., Mounirou B., Bougoudogo F., Ravel S., Bibollet-Ruche F., Delaporte E.(1998). Genetic subtypes of HIV type 1 and HIV type 2 strains in commercial sex workers from Bamako, Mali. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 14: 51-58.
250. Peeters M., Liegeois F., Bibollet-Ruche F., Patrel D., Vidal N., Esu-Williams E., Mboup S., Mpoudi N.E., Koumaré B., Nzila N., Perret J.L., Delaporte E.(1998). Subtype-specific polymerase chain reaction for the identification of HIV-1 genetic subtypes circulating in Africa. *AIDS*, 12: 671-686.
251. Peeters M., Liegeois F., Torimiro J., Bourgeois A., Mpoudi E., Vergne L., Saman E., Delaporte E., Saragosti S.(1999). Characterization of a highly replicative intergroup M/O human immunodeficiency virus type 1 recombinant isolated from a Cameroonian patient. *J Virol*, 73: 7368-7375.
252. Peeters M., Sharp P.M.(2000). Genetic diversity of HIV-1: the moving target. *AIDS*, 14 (suppl 3): S129-S140.
253. Perelson A.S., Neumann A.U., Markowitz M., Leonard J.M., Ho D.D.(1996). HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*, 271: 1582-1586.
254. Pettit S.C., Moody M.D., Webbie R.S., Kaplan A.H, Nantermet P.V., Klein C.A., Swanstrom R.(1994). The p2 domain of human immunodeficiency virus type 1 gag regulates sequential proteolytic processing and is required to produce fully infectious virions. *J Virol*, 68: 8017-8027.
255. Pfulzner A., Dietrich U., Von Eichrel U., Von Briesen H., Brede H.D., Maniar J.K., Rubsamen-Waigmann H.(1992). HIV-1 and HIV-2 infections in a high-risk population in Bombay, India: evidence for the spread of HIV-2 and presence of a divergent HIV-2 subtype. *J Acquir Imm Defic Syndr*, 5: 972-977.
256. Pieniazek D., Ellenberger D., Janini L.M., Ramos A.C., Nkengasong J., Sassan-Morokro M., Hu D.J., Coulibally I.M., Ekpini E., Bandea C., Tanuri A., Greenberg A.E., Wiktor S.Z., Rayfield M.A.(1999). Predominance of human immunodeficiency virus type 2 subtype B in Abidjan, Ivory Coast. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 15: 603-608.
257. Pieniazek D., Rayfield M., Hu D.J., Nkengasong J., Wiktor S.Z., Downing R., Biryahwaho B., Mastro T., Tanuri A., Soriano V., Lal R., Dondero T.(2000). Protease

sequences from HIV-1 group M subtypes A-H reveal distinct amino acid mutation patterns associated with protease resistance in protease inhibitor-naïve individuals worldwide. HIV variant Working Group. *AIDS*, 14: 1489-1495.

258. Piyasirisilp S., McCutchan F.E., Carr J.K., Sanders-Buell E., Liu W., Chen J., Wagner R., Wolf H., Shao Y., Lai S., Beyrer C., Yu X.F.(2000). A recent outbreak of human immunodeficiency virus type 1 infection in southern China was initiated by two highly homogeneous, geographically separated strains, circulating recombinant form AE and a novel BC recombinant. *J Virol*, 74: 11284-11295.

259. Plantier J.C., Damond F., Lasky M., Sankalé J.L., Apatrei C., Peeters M., Buzelay L., Mboup S., Kanki P., Delaporte E., Simon F., Barin F.(1999). V3 serotyping of HIV-1 infection : correlation with genotyping and limitations. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 20: 432-441.

260. Plantier J.C., Damond F., Souquières S., Brun-Vézinet F., Simon F., Barin F.(2001). V3 serological subtyping of human immunodeficiency virus type 2 infection is not relevant. *J Clin Microbiol*, 39: 3803-3807.

261. Plantier J.C., Vergne L., Damont F., Mboup S., Mpoudi-Ngole E., Buzelay L., Farfara I., Brand D., Peeters M., Brun-Vézinet F., Delaporte E., Barin F.(2002). Development and evaluation of a DNA enzyme immunoassay method for env genotyping of subtypes A through G of human immunodeficiency virus type 1 group M, with discrimination of the circulating recombinant forms CRF01_AE and CRF02_AG. *J Clin Microbiol*, 40: 1010-1022.

262. Pohlmann S., Soilleux E.J., Baribaud F., Leslie G.J., Morris L.S., Trowsdale J., Lee B., Coleman N., Doms R.W.(2001). DC-SIGNR, a novel DC-SIGN homologue expressed in endothelial cells, binds to human and simian immunodeficiency viruses and activates infection in trans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 2670-2675.

263. Popper S.J., Sarr A.D., Travers K.U., Gueye-Ndiaye A., Mboup S., Essex M.E., Kanki P.(1999). Lower human immunodeficiency virus (HIV) type 2 viral load reflects the difference in pathogenicity of HIV-1 and HIV-2. *J Infect Dis*, 180: 1116-1121.

264. Poulin L., Fauchon M., Darveau A., Levy J.A.(1994). Inhibition of protein synthesis by the human immunodeficiency virus type 1 Nef gene product. *J Gen Virol*, 75: 2977.

265. Preston B.D., Poiesz B.J., Loeb L.A.(1988). Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase.

Science, 242: 1168-1171.

266. Quigley M.A., Weiss H.A., Hayes R.J.(2001). Male circumcision as a measure to control HIV infection and other sexually transmitted diseases. *Curr Opin Infect Dis*, 14: 71-75.

267. Ramos A., Hu D.J., Nguyen L., Phan K.O., Vanichseni S., Promadej N., Choopanya K., Callahan M., Young N.L., McNicholl J., Mastro T.D., Folks T.M., Subbarao S. (2002). Intersubtype human immunodeficiency virus type 1 superfection following seroconversion to primary infection in two injection drug users. *J Virol*, 76: 7444-7452.

268. Ramsey C.A., Parganiban A.T.(1993). Replication of retroviral terminal repeat sequence during in vivo reverse transcription. *J Virol*, 67: 4114-4121.

269. Rayfield M.A., Sullivan P., Bandea C.I., Britvan L., Otten R.A., Pu C.P., Pieniazek D., Subbarao S., Simon P., Schable C.A., Wright A.C., Ward J., Schochetman G.(1996). HIV-1 group O identified for the first time in the United States. *Emerg Infect Dis*, 2 : 209-212.

270. Rayfield M.A., Downing R.G., Baggs J., Hu D.J., Pieniazek D., Luo C.C., Biryahwoho B., Otten R.A., Sempala S.D., Dondero T.J.(1998). A molecular epidemiologic survey of HIV in Uganda. HIV variant Working Group. *AIDS*, 12: 521-527.

271. Reeves J.D., Hibbitts S., Simmons G., McKnight A., Azevedo-Pereira J.M., Moniz-Pereira J., Clapham P.R.(1999). Primary human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) isolates infect CD4-negative cells via CCR5 and CXCR4: comparison with HIV-1 and simian immunodeficiency virus and relevance to cell tropism in vivo. *J Virol*, 73: 7795-7804.

272. Renjifo B., Fawzi W., Mwakagile D., Hunter D., Msamanga G., Spiegelman D., Garland M., Kagoma C., Kim A., Chaplin B., Hertzmar E., Essex M.(2001). Differences in perinatal transmission among human immunodeficiency virus type 1 genotypes. *J Hum Virol*, 4: 16-25.

273. Respass R.A., Butcher A., Wang H., Chaowanachan T., Young N., Shaffer N., Mastro T.D., Biryahwoho B., Downing R., Tanuri A., Schechter M., Pascu R., Zekeng L., Kaptue L., Gürtler L., Eberle J., Ellenberger D., Fridlund C., Rayfield M., Kwok S.(1997). Detection of genetically diverse human immunodeficiency virus type 1 group M

and O isolates by PCR. *J Clin Microb*, 35: 1284-1286.

274. **Robben K.E., Bandea C.I., Levin A., Goedert J.J., Blattner W.A., Brubaker G., Brown T.M., Schochetman G., Kalish M., Shao J., O'Brien T.R.**(1996). Genetic variability of Human Immunodeficiency Virus type 1 in rural Northwest Tanzania. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 12: 1389-1391.

275. **Robbins K.E., Kostrikis L.G., Brown T.M., Anzala O., Shin S., Plummer F.A., Kalish M.L.**(1999). Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 strains in Kenya: a comparison using phylogenetic analysis and a combinatorial melting assay. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 15: 329-335.

276. **Roberts J.D., Bebenek K., Kunkel A.**(1988). The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science*, 242: 1171-1173.

277. **Robertson D.L., Bradac J.A., Carr J.K., Foley B., Funkhouser R.K., GAO F., Hahn B.H., Kalish L., Kuiken C., Learn G.H., Leitner T., McCutchan F., Osmanov S., Peeters M., Pienazek D., Salminen M., Sharp P.M., Wolinsky S., Korber B.**(1999). HIV-1 nomenclature proposal. *Science*, 288: 55-56.

278. **Robertson D.L., Hahn B.H., Sharp P.M.**(1995). Recombination in AIDS viruses. *J Mol Evol*, 40: 249-259.

279. **Rodenburg C.M., Li Y., Trask S.A., Chen Y., Decker J., Robertson D.L., Kalish M.L., Shaw G.M., Allen S., Hahn B.H., Gao F., The UNAIDS and NAID Networks for HIV Isolation and Characterization.**(2001). Near full-length clones and reference sequences for subtype C isolates of HIV type 1 from three different continents. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 17: 161-168.

280. **Roderiquez G., Orevetz T., Yanagishita M., Bou-Habib D.C., Mostowski H., Norcross M.A.**(1995). Mediation of human immunodeficiency virus type 1 binding by interaction of cell surface heparan sulfate proteoglycans with the V3 region of envelope gp120-gp41. *J Virol*, 69: 2233-2239.

281. **Rousseau C.M., Nduati R.W., Richardson B.A., Steele M.S., John-Stewart G.C., Mbori-Ngacha D.A., Kreiss J.K., Overbaugh J.**(2003). Longitudinal analysis of human immunodeficiency virus type 1 RNA in breast milk and of its relationship to infant infection and maternal disease. *J Infect Dis*, 187: 741-747.

282. **Rouzioux C., Burgard M., Chaix M.L., Manigart O., Ivanoff S., Doussin A., Ngo**

- N., Tachet A., Blanche S., Mayaut M.J.(1997). Quantification of non-B subtype HIV RNA: underestimation is frequent for all non-B subtypes with Monitor and NASBA-QT tests. *4th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*, 22-26 January, Washington DC.
283. Rouzioux C., Costagliola D., Burgard M., Blanche S., Mayaux M.J., Griscelli C., Valleron A.J., And Group a.t.h.i.i.n.f.(1995). Estimated timing of mother-to-child human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmission of Markov model. *Am J Epidemiol*, 142: 1330-1339.
284. Rowland-Jones S.L., Dong T., Fowke K.R., Kimani J., Krausa P., Newell H., Blanchard T., Ariyoshi K., Oyugi J., Ngugi E., Bwayo J., MacDonald K.S., McMichael A.J.(1998). Cytotoxic T cell responses to multiple conserved HIV epitopes in HIV-Resistant prostitutes in Nairobi. *J Clin Invest*, 102: 1758-1765.
285. Rowland-Jones S.L., McMichael A.(1995). Immune responses in HIV-exposed seronegatives: have they repelled the virus? *Current Biol*, 7 : 448-455.
286. Rowland-Jones S.L., Sutton J., Ariyoshi K., Dong T., Gotch F.M., McAdam S., Whitby D., Sabally S., Gallimore A., Corrah T, et al.(1995). HIV-specific cytotoxic T cells in HIV-exposed but uninfected Gambian women. *Nat Med*, 1: 59-64.
287. Ruhl M., Himmelspach M., Bahr G., Hammerschmid F., Jacksche H., Wolff B., Aschauer H., Farrington G.K., Probst H., Bevec D. et al (1993). Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating trans-activation. *J Cell Biol*, 123:1309-1320.
288. Saag M.S., Holodniy M., Kuritzkes D.R., O'Brien W.A., Coombs R., Poscher M.E., Jacobsen D.M., Shaw G.M., Richman D.D., Volberding P.A. (1996). HIV viral load markers in clinical practice. *Nature Med*, 2: 625-629.
289. Safrit J.T., Koup R.A.(1995). The immunology of primary HIV infection: which immune responses control HIV replication? *Current Biol*, 7: 456-461.
290. Saitou N., Nei M.(1980). The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4: 406-425.
291. Saksela K., Cheng G., Baltimore D.(1995). Proline rich (PXXP) motifs of HIV-1 Nef bind to SH3 domains of a subset of Src kinases, and are required for the enhanced growth of Nef+ viruses but not down-regulation of CD4. *EMBO J*, 14: 484.

292. Salemi M., Strimmer K., Hall W., et al.(2000). Dating the common ancestor of SIVcpz and HIV-1 group M and the origin of HIV-1 subtypes using a new method to uncover clock-like molecular evolution. *FASEB J*, 10: 1096.
293. Sanders-Buell E., Salminen M.O., McCutchan F.E.(1995). Sequencing primers for HIV-1. In: *Human Retroviruses and AIDS*. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, pp III15-III21.
294. Sarr A.D., Sankalé J.L., Gueye-Ndiaye A., Essex M., Mboup S., Kanki P.(2000). Genetic analysis of HIV type 2 in monotypic and dual HIV infections. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 16: 295-298.
295. Schable C., Zekeng L., Pau C.-P., Hu D., Kaptue L., Gürtler L., Dondero T., Tsague J.M., Schochetman G., Jaffe H., George H.(1994). Sensitivity of United States HIV Antibody Tests for detection of HIV-1 group O infections. *Lancet*, 334: 1333-1334.
296. Schim van der Loeff M.F., Aaby P.(1999). Towards a better understanding of the epidemiology of HIV-2. *AIDS*, 13: S69-S84.
297. Schwartz O., Maréchal V., Le Gall S., Lemonnier F., Heard J.M.(1996). Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 nef protein. *Nature Medicine*, 2: 338-342.
298. Schwartz S., Felber B.K., Feny E.M., Pavlakis G.N.(1990). Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *J Virol*, 64: 5440.
299. Scott W.S., Griffith J.D.(1994). Human immunodeficiency virus type 1 may preferentially integrate into chromatin occupied by L1Hs repetitive elements. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 5557.
300. Sheldon M.R., Ratnasabapathy S., Hernandez N.(1993). Characterisation of the inducer of shorts transcripts, a human immunodeficiency virus type 1 transcriptional element that activates the synthesis of short RNAs. *Mol Cell Biol*, 13: 1251-1263.
301. Shpaer E.G., Mullins J.I.(1993). Rate of amino acid change in the envelope protein correlate with pathogenicity of primates lentiviruses. *J Mol Evol*, 37: 57-65.
302. Simon F., Loussert-Ajaka I., Damond F., Saragosti S., Barin F., Brun-Vezinet F.(1996). HIV type 1 diversity in northern Paris, France. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 12:

1427-1433.

303. Simon F., Ly T.D., Baillou-Beaufils A., Schneider-Fauveau V., De Saint-Martin J., Loussert-Ajaka I., Chaix M.L., Saragosti S., Courouce A.M., Ingrand D., Janot C., Brun-Vezinet F.(1994). Sensitivity of screening kits for anti-HIV subtype O antibodies. *AIDS*, 8: 1628-1629.
304. Simon F., Maucière P., Roques B., Loussert-Ajaka I., Muller-Trutwin M.C., Saragosti S., George-Courbot M.C., Barré-Sinoussi F., Brun-Vézinet F.(1998). Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nature Med*, 4: 1032-1037.
305. Sloand E.M., Kumar P.N., Kim S., Chauduri A., Weichold F.F., Young N.S.(1999). Human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor modulates activation of peripheral blood CD+ T cells and decreases their susceptibility to apoptosis in vitro and in vivo. *Blood*, 94: 1021-1027.
306. Songok E.M., Libondo D.K., Rotich M.C., Oogo S.A., Tukei P.M.(1996). Surveillance for HIV-1 subtypes O and M in Kenya. *Lancet*, 347: 1700.
307. Soriano V., Gutierrez M., Garcia-Lerma G., Aguilera O., Mas A., Bravo R., Perrez-Labad M., Gonzalez-Lahoz J.(1996). First case of group O infection in Spain. *Vox Sang*, 71: 66.
308. Soto-Ramirez L., Renjifo B., McLane M.F., Marlink R., O'hara R., Sutthent R., Wasi C., Vithayasai P., Vithayasai V., Apichartpiyakul P., Cruz V.P., Chui D-S., Osathanondh R., Mayer K., Lee T-H., Essex M.(1996). HIV-1 Langerhans'cell tropism associated with heterosexual transmission of HIV. *Science*, 271: 1291-1293.
309. Starr-Spires L.D., Collman R.G.(2002). HIV-1 entry and entry inhibitors as therapeutic agents. *Clin Lab Med*, 22 : 681-701.
310. Steinman R.M.(2000). DC-SIGN: a guide to some mysteries of dendritic cells. *Cell*, 100: 491-494.
311. Sterling T.R., Hoover D.R., Astemborski J., Vlahov D., Bartlett J.G., Schupbach J.(2002). Heat-denatured human immunodeficiency virus type 1 protein 24 antigen: prognostic value in adults with early-stage disease. *J Inf Dis*, 186: 1181-1185.
312. Stiem E.R., Vink P.(1991). Transmission of HIV by breast feeding. *J Pediatr*, 118:

410-412.

313. **Stimson G.V.(1993)**. The global diffusion of injecting drug use: implications for human immunodeficiency virus infection. *Bull Narc*, 45: 3-17.
314. **Su L., Graf M., Zhang Y., Von Briesen H., Xing H., Kostler J., Metz H., Wolf H., Shao Y., Wagner R.(2000)**. Characterization of a virtually full-length human immunodeficiency virus type 1 genome of a prevalent intersubtype (C/B') recombinant strain in China. *J Virol*, 74: 11367-11376.
315. **Subbarao S., Luo C.C., Limpakarnjanarat K., Bhumisawasdi J., Young N.L., Mastro T.D., Schochetman G., Kalish M.L.(1996)**. Evaluation of oligonucleotide probes for the determination of the two major HIV-1 *env* subtypes in Thailand (letter). *AIDS*, 10: 350-351.
316. **Takehisa J., Zekeng L., Ido E., Yamaguchi-Kabata Y., Mboudjeka I., Harada Y., Miura T., Kaptue L., Hayami M.(1999)**. Human immunodeficiency virus type intergroup (M/O) recombination in Cameroon. *J Virol*, 73: 6810-6820.
317. **Tang J., Tang S., Lobashevsky E., Myracle A.D., Fideli U., Aldrovandi G., Allen S., Musonda R., Kaslow R.A., and Zambia-UAB HIV Research Project.(2002)**. Favorable and unfavorable HLA class I alleles and haplotypes in Zambians predominantly infected with clade C human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 76: 8276-8284.
318. **Taylor J.P., Pomerantz R., Bagasra O., Chawdhury M., Rappaport J., Khalili K., Amini S.(1992)**. TAR-independent transactivation by Tat in cells derived from CNS: a novel mechanism of HIV-1 gene regulation. *EMBO J*, 11: 3395-3403.
319. **Temin H.M.(1993)**. Retrovirus variation and reverse transcription: abnormal strand transfer result in retrovirus genetic variation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 6900-6903.
320. **Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J.(1994)**. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res*, 22: 4673-4680.
321. **Thomson M.M., Delgado E., Herrero I., Villahermosa M.L., Vazquez de Parga E., Cuevas M.T., Carmona R., Medrano L., Perez-Alvarez L., Cuevas L., Najera R. (2002)**. Diversity of mosaic structures and common ancestry of human immunodeficiency virus type 1 BF intersubtype recombinant viruses from argentina revealed by analysis of near full-length genome sequences. *J Gen Virol*, 83: 107-119.

322. Thomson M.M., Perez-Alvarez L., Najera R.(2002). Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. *Lancet Infect Dis*, 2: 461-471.
323. Touré-Kane C., Montavon C., Faye M.A, Guèye P.M., Sow P.S., Ndoye I., Gaye-Diallo A., Delaporte E., Peeters M., Mboup S.(2000). Identification of all HIV type 1 group M subtypes in Senegal, a country with low and stable seroprevalence. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 16: 603-609.
324. Travers K., Mboup S., Marlink R., Gueye-Ndiaye A., Siby T., Thior I., Traoré I., Dieng-Sarr A., Sankalé J-L., Mullins C., Ndoye I., Hsieh C-C., Essex M., Kanki P.(1995). Natural protection against HIV-1 infection provided by HIV-2. *Science*, 268: 1612-1615.
325. Tristem M.C., Marshall C., Karpas A., Petrik J., Hill F.(1990). Origin of Vpx in lentiviruses [letter]. *Nature*, 347: 341-342.
326. Triques K., Bourgeois A., Saragosti S., Vidal N., Mpoudi-Ngole E., Nzilambi N., Apatrei C., Ekwalinga M., Delaporte E., Peeters M. (1999). High diversity of HIV-1 subtype F strains in Central Africa. *Virology*, 259: 99-109.
327. Triques K., Bourgeois A., Vidal N., Mpoudi-Ngole E., Mulanga-Kabeya C., Nzilambi N., Torimiro J., Saman E., Delaporte E., Peeters M. (2000). Near-full-length genome sequencing of divergent african HIV type 1 subtype F viruses leads to the identification of a new HIV type 1 subtype designated K. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 16: 139-151.
328. Triques K., Coste J., Perret J.L., Segarra C., Mpoudi E., Reynes J., Delaporte E., Butcher A., Dreyer K., Herman S., Spadoro J., Peeters M.(1999). Efficiencies of four versions of the AMPLICOR HIV-1 MONITOR test for quantitation of different subtypes of human immunodeficiency virus type 1. *J Clin Microbiol*, 37: 110-116.
329. Trono D.(1992). Partial reverse transcripts in virions from human immunodeficiency and murine leukemia viruses. *J Virol*, 66: 4893-4900.
330. Vandamme A.M., Schmit J.C., Van Dooren S., Van Laethem K.V., Gobbers K., Kok W., Goubau P., Witrouw M., Peetermans W., De Clercq E., Desmyter J.(1996). Quantification of HIV-1 RNA in plasma: comparable results with the NASBA HIV-1 RNA QT and the AMPLICOR HIV Monitor Test. *J AIDS*, 13: 127-139.

331. Van Den Haesevelde M.M., Decourt J-L., De Leys R., Vanderbroght B., Van Der Groen G., Van Heuverswijn H., Saman E.(1994). Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent african human immunodeficiency virus isolate. *J Virol*, 68: 1586-1596.
332. Van De Perre P., Simono A., Msellati P., Hitimana D.G., Vaira D., Bazubagira A., Van Goethem C., Stevens A.M., Karita E., Sondag-Thull D., *et al.*(1991). Postnatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mother to infant. A prospective cohort study in Kigali, Rwanda. *N Engl J Med*, 325: 593-598.
333. Van De Perre P., Meda N., Cartoux M., Leroy V., Dabis F.(1997). Late postnatal transmission of HIV-1 and early weaning. *Lancet*, 350: 221.
334. Van Der Loeff, Aaby P.(1999). Towards a better understanding of the epidemiology of HIV-2. *AIDS*, 13: 69-84.
335. Van Harmelen J., Van Der Ryst E., Wood R., Lyons S.F., Williamson C.(1999). Restriction Fragment Length Polymorphism analysis for rapid gag subtype determination of human immunodeficiency virus type 1 in South Africa. *J Virol Methods*, 78: 51-59.
336. Velazquez-Campoy A., Kiso Y., Freire E.(2001). The binding energetics of first- and second-generation HIV-1 protease inhibitors: implications for drug design. *Arch Biochem Biophysics*, 390: 169-175.
337. Vergne L., Peeters M., Mpoudi-Ngolé E., Bourgeois A., Liegeois F., Touré-Kane C., Mboup S., Mulanga-Kabeya C., Saman E., Jourdan J., Reynes J., Delaporte E.(2000). Genetic diversity of protease and reverse transcriptase sequences in non-subtype-B human immunodeficiency virus type 1 strains: evidence of many minor drug resistance mutations in treatment-naive patients. *J Clin Microbiol*, 38: 3919-3925.
338. Viard J-P., Rouzioux C.(2002). Les antirétroviraux utilisés en multithérapie : molécules, cibles, pharmacologie, bases des associations thérapeutiques. *Annales de l'Institut Pasteur/Actualités*, 12: 13-22.
339. Vidal N., Mulanga-Kabeya C., Nzilambi N., Delaporte E., Peeters M.(2000). Identification of a complex env subtype E HIV type 1 from the Democratic Republic of Congo, recombinant with A, G, H, J, K, and unknown subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 16: 2059-2064.
340. Vidal N., Peeters M., Mulanga-Kabeya C., Nzilambi N., Robertson D., Ilunga W.,

- Sema H., Tshimanga K., Bongo B., Delaporte E.(2000). Unprecedented degree of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M genetic diversity in Democratic Republic of Congo suggests that the HIV-1 pandemic originated in Central Africa. *J Virol*, 74: 10498-10507.
341. Von Schwedler U., Song J., Aiken C., Trono D.(1993). Vif is crucial for human immunodeficiency type 1 proviral DNA synthesis in infected cells. *J Virol*, 67: 4945-4955.
342. Weber B., Meier T., Enders G.(2002). Fourth génération human immunodeficiency virus (HIV) screening assays with an improved sensitivity for p24 antigen close the second diagnostic window in primary HIV infection. *J Clin Virol*, 25: 357-359.
343. Wei X., Ghosh S.K., Taylor M.E., Johnson V.A., Emini E.A., Deutsch P., Lifson J.D., Bonhoeffer S., Nowak M.A., Hahn B.H., Saag M.S., Shaw G.M.(1995). Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature*, 373: 117-122.
344. Weisman Z., Kalinkovich A., Barkow G., Stein M., Greenberg Z., Bentwich Z.(1999). Infection by different HIV-1 subtypes (B and C) results in a similar immune activation profile despite distinct immune backgrounds. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 21: 157-163.
345. Weisser B.(1994). Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 during pregnancy: relationship of viral titer to mother-to-child transmission and stability of viral load. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 8037-8041.
346. Westendorp M.O., Li-Weber M., Frank R.W., Krammer P.H.(1994). Human immunodeficiency virus type 1 Tat upregulates interleukin-2 secretion in activated T-cells. *J Virol*, 68: 4177-4185.
347. Wiktor S.Z., Nkengasong J.N., Ekpini E.R., Adjorlolo-Johnson G.T., Ghys P.D., Brattegaard K., Tossou O., Dondero T.J., De Cook K.M., Greenberg A.E.(1999). Lack of protection against HIV-1 infection among women with HIV-2 infection. *AIDS*, 13: 695-659.
348. Wilbe K., Casper C., Albert J., Leitner T.(2002). Identification of two CRF11_cpx genomes and two preliminary representatives a new circulating recombinant form (CRF13_cpx) of HIV type 1 in Cameroon. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 18: 849-856.
349. Wolinsky S.M., Korber B.T., Neumann A.U., Daniels M., Kunstman K.J., Whetsell A.J., Furtado M.F., Cao Y., Ho D.D., Safrit JT.(1996). Adaptative evolution of human

immunodeficiency virus during the natural course of infection. *Science*, 272: 537-542.

350. **Yachi N., Baghdigian S., Moreau H., Fantini J.**(1992). Galactosyl ceramide (or closely related molecules) is the receptor for human immuno-deficiency virus type 1 on human colon epithelia HT29 cells. *J Virol*, 66: 4848.

351. **Yamaguchi J., Devare S.G., Brennan C.A.**(2000). Identification of a new HIV-2 subtype based on phylogenetic analysis of full-length genomic sequence. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 16: 925-930.

352. **Yamaguchi J., Vallari A.S., Swanson P., Bodelle P., Kaptue L., Ngansop C., Zekeng L., Gürtler L.G., Devare S.G., Brennan C.A.**(2002). Evaluation of HIV type 1 group O isolates: identification of five phylogenetic clusters. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 18: 268-282.

353. **Yao X.J., Garzon S., Boisvert F., Haseltine W.A., Cohen E.A.**(1993).The effect of Vpu on HIV-1-induced syncytia formation. *J Acquir Immun Defic Syndr*, 6: 135.

354. **Yi Y., Rana S., Turner J.D., Gaddis N., Collman R.G.**(1998). CXCR-4 is expressed by primary macrophages and supports CCR5-independent infection by dual-tropic but not T-tropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 72: 772-777.

355. **Yu-Kimata M.T., Cella M., Biggins J.E., Rorex C., White R., Hicks S., Wilson J.M., Patel P.G., Allan J.S, Colonna M., Kimata J.T.**(2002). Capture and transfer of simian immunodeficiency virus by macaque dendritic cells is enhanced by DC-SIGN. *J Virol*, 76: 11827-11836.

356. **Zanchetta N., Nardi G., Tocalli L., Drago L., Bossi C., Pulvirenti F.R., Galli C., Gismondo M.R.**(2000). Evaluation of the abbot LCx HIV-1 RNA quantitative, a new assay for quantitative determination of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J Clin Microbiol*, 38: 3882-3886.

357. **Zekeng L., Gürtler L., Afane-Ze E., Sam-Abbenyi A., Mbouni-Essomba G., Mpoudi-Ngolle E., Monny-Lobbe M., Tapko J.B., Kaptue L.**(1994). Prevalence of HIV-1 subtype O infection in Cameroon : preliminary results. *AIDS*, 8: 1626-1628.

358. **Zhang L., Diaz R.S., Ho D.D., Mosley J.W., Busch M.P., Mayer A.**(1997). Host-specific driving force in human immunodeficiency virus type 1 evolution in vivo. *J Virol*, 71: 2555-2561.

359. Zhang L., Carruthers C.D., He T., Huang Y., Cao Y., Wang G., Hahn B., Ho D.D.(1997). HIV type 1 subtypes, coreceptor usage, and CCR5 polymorphism. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 13: 1357-1366.
360. Zhang Y.M., Dawson S.C., Landsman D., Lane H.C., Salzman N.P.(1994). Persistence of four related HIV subtypes during the course of zidovudine therapy: relationship between virion RNA and proviral DNA. *J Virol*, 68: 425-432.
361. Zhu T., Korber B.T., Nahmias A.J., Hooper E., Sharp P.M., Ho D.D.(1998). An african HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic *Nature*, 391: 594-597.
362. Zinkernagel R.M.(1996). Immunology taught by viruses. *Science*, 271: 173-178.

1954

1954

1954

1954

1954

1954

1954

1954

RESUME-ABSTRACT

RESUME

Les variants génétiques du VIH-1 sont classés en groupes, sous-types, sous-sous-types, CRFs et recombinants uniques. Le but de ce travail était de documenter cette diversité génétique du VIH-1 au Niger.

Pour les variants du groupe M, après séquençage et analyse phylogénétique des régions env(V3V5) et gag(p24) de 110 souches provenant de patients en majorité symptomatiques, nous avons observé :

- la circulation de 14 variants (env/gag) différents : CRF02_AG (54,3%) , CRF06_cpx (18,1%) , CRF06/CRF02 (8,2%), A/CRF02 (5,3%), G (4,4%), A/A (1,7%), CRF02/A (1,7%), A2/A2 (0,9%), A/G(0,9%), G/A (0,9%), G/B-D(0,9%), G/CRF02(0,9%), CRF02/CRF06(0,9%), CRF02/B-D(0,9%).
- la prédominance des CRF02_AG et CRF06_cpx aussi bien en 1997 qu'en 2000,
- l'émergence de recombinants inter-CRFs complexes et de différents profils confirmés par une étude génomique complète de trois souches.

Pour les variants du groupe O, l'étude sérologique rétrospective de 2619 échantillons nous a montré que ces virus sont retrouvés dans 0,3% des sérums VIH positifs, et qu'ils circulaient déjà en 1990. L'étude moléculaire d'une des cinq souches détectées a pu se faire au niveau d'une région correspondant à un domaine immunodominant de la glycoprotéine transmembranaire gp41.

Mots Clés : VIH-1, Diversité génétique, Groupes, Génotypes, CRF, Recombinants, Niger.

ABSTRACT

HIV-1 genetic variants are classified in groups, subtypes, sub-subtypes, CRFs and unique recombinants. The aim of this study was to document this HIV-1 genetic diversity in Niger.

For the group M variants, after sequencing and phylogenetic analysis of env (V3V5) and gag (p24) regions of 110 strains from mainly symptomatic patients, we observed:

-the circulation of 14 different variants (env/gag): CRF02_AG (54,3%) , CRF06_cpx (18,1%) , CRF06/CRF02 (8,2%), A/CRF02 (5,3%), G (4,4%), A/A (1,7%), CRF02/A (1,7%), A2/A2 (0,9%), A/G(0,9%), G/A (0,9%), G/B-D(0,9%), G/CRF02(0,9%), CRF02/CRF06(0,9%), CRF02/B-D(0,9%).

-the predominance of CRF02_AG and CRF06_cpx in 1997 and in 2000,

-the emergence of complex inter-CRFs recombinants with different profiles confirmed par full-length genomic analysis of three strains.

For the group O variants, retrospective serological study of 2619 samples showed these virus markers in 0,3% of HIV-positive samples, and there circulation since 1990. Molecular study of one of the five strains founded was done in a region corresponding to a immunodominant domain of the transmembrane glycoprotein gp41.

Key Words: HIV-1, Genetic diversity, Groups, Genotypes, CRFs, Recombinants, Niger.

ANNEXE

VU
LE PRESIDENT DU JURY

VU
LE DOYEN

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
LE RECTEUR DE L'UNIVERSITE CHEICKH ANTA DIOP