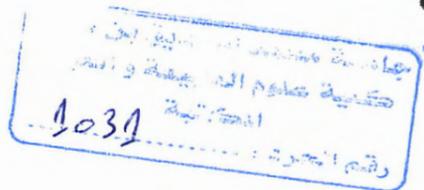


REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE JJEL



1103.15/07

FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

## Mémoire

DE FIN D'ÉTUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME D'ÉTUDES  
SUPERIEURES EN BIOLOGIE

OPTION : MICROBIOLOGIE

Thème :

# LA THERAPIE GENIQUE ANTI-HIV

Membres du Jury :

- ◆ ENCADREUR : M<sup>r</sup> Aichour R.
- ◆ EXAMINATEUR : M<sup>elle</sup> Benseghier S.

Présenté par :

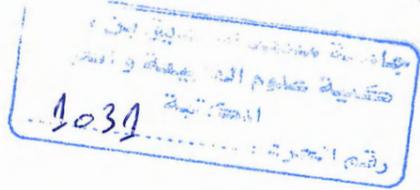
- ◆ Dahmani Farida
- ◆ Kemmache Widad
- ◆ Sayoud Abdel Ali

Promotion : Juin 2007



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE JIJEL



113.15/07

FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

## Mémoire

DE FIN D'ÉTUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME D'ÉTUDES  
SUPERIEURES EN BIOLOGIE

OPTION : *MICROBIOLOGIE*

*Thème :*

# LA THERAPIE GENIQUE ANTI-HIV

Membres du Jury :

- ◆ ENCADREUR : M<sup>r</sup> Aichour R.
- ◆ EXAMINATEUR : M<sup>elle</sup> Benseghier S.

Présenté par :

- ◆ Dahmani Farida
- ◆ Kemmache Widad
- ◆ Sayoud Abdel Ali

*Promotion : Juin 2007*



# REMERCIEMENT

Avant tout, nous remercions Dieu le tout puissant de nous avoir donné la force de faire ce travail, de nous avoir guidé vers la réussite dans notre vie et de nous avoir protégé jusqu'à ce qu'on atteigne nos buts.

Nous aimerions remercier les membres du Jury pour leur présence lors de notre présentation.

Nous tenons à remercier notre encadreur M. Aichour Ridha pour son soutien, son suivi attentif et ces précieux conseils durant toute la durée de ce mémoire.

Enfin, Nos remerciements vont également à tous ceux qui nous ont aidé de près ou de loin à la réalisation de ce projet de fin d'étude.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....IV

ABREVIATIONS.....V

INTRODUCTION ..... 1

**CHAPITRE I GÉNÉRALITÉS**

**I.1 DÉFINITION.....2**

**I.2 HISTORIQUE.....2**

**I.3 VIRUS RESPONSABLE : le HIV .....3**

    I.3.1 Origine.....3

    I.3.2 Classification.....3

    I.3.3 Caractères généraux .....3

    I.3.4 Structure du HIV .....4

        I.3.4.1 Le génome du HIV .....5

            I.3.4.1.1 Les gènes gag, pol et env.....5

            I.3.4.1.2 Les gènes supplémentaires .....5

    I.3.5 Mode d'action du HIV.....6

    I.3.6 Le cycle de réplication du virus HIV.....7

**I.4 ÉVOLUTION DE L'INFECTION.....9**

    I.4.1 Les signes cliniques suivants les Phases de la maladie.....10

        I.4.1.1 Primo-infection.....10

        I.4.1.2 Phase asymptomatique.....10

        I.4.1.3 Pré SIDA et SIDA déclaré.....10

    I.4.2 La maladie chez l'enfant.....10

**I.5 TRANSMISSION DE LA MALADIE.....11**

    I.5.1 Voie sanguine.....11

    I.5.2 Voie sexuelle.....12

    I.5.3 Transmission transplacentaire et allaitement.....12

**I.6 DÉPISTAGE ET DIAGNOSTIC.....13**

    I.6.1 Dépistage.....13

        I.6.1.1 Antigénémie P24.....13

I.6.1.2 Tests de recherche d'anticorps anti- HIV.....	13
I.6.1.3 Tests de recherche du virus.....	15
I.6.1.4 Tests mixtes.....	16
I.6.2 Le diagnostic.....	16
I.7 LES MALADIES OPPORTUNISTES ASSOCIÉES AU SIDA.....	16

## **CHAPITRE II      STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES ANTI – HIV**

<b>II.1. LA CHIMIOTHÉRAPIE.....</b>	<b>17</b>
II.1.1 Les inhibiteurs de la transcriptase inverse.....	17
II.1.1.1 Les inhibiteurs nucléosidiques.....	17
II.1.1.2 Les inhibiteurs non nucléosidiques.....	19
II.1.2 les inhibiteurs des protéases.....	19
II.1.3 Association d'antirétroviraux.....	20
<b>II.2 PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES ET VACCINALES.....</b>	<b>20</b>
II.2.1 Immunothérapie.....	20
II.2.1.1 L'interleukine – 2.....	20
II.2.1.2 L'interféron $\alpha$ .....	21
II.2.2 La vaccinothérapie.....	21
II.2.3 La thérapie génique.....	21

## **CHAPITRE III      LA THÉRAPIE GÉNIQUE**

<b>III.1 DÉFINITION.....</b>	<b>22</b>
<b>III.2 HISTORIQUE .....</b>	<b>22</b>
<b>III.3 LES CATÉGORIES DE LA THÉRAPIE GÉNIQUE.....</b>	<b>22</b>
III.3.1 La thérapie génique germinale.....	22
III.3.2 La thérapie génique somatique.....	22
<b>III.4 LES OUTILS DE LA THÉRAPIE GÉNIQUE.....</b>	<b>23</b>
III.4.1. Les vecteurs viraux.....	23
III.4.1.1 Les rétrovirus.....	23
III.4.1.2 Les adénovirus .....	24
III.4.1.3 Virus adéno- associé (AAV) .....	25
III.4.2 Les vecteurs non viraux.....	25

<b>III.5 LES DIFFÉRENTES MÉTHODES DE LA THÉRAPIE GÉNIQUE .....</b>	<b>26</b>
III.5.1 La thérapie génique ex vivo.....	26
III.5.2 La thérapie génique in situ.....	27
III.5.3 La thérapie génique in vivo.....	27
<b>III.6 LES ÉTAPES DE LA THÉRAPIE GÉNIQUE .....</b>	<b>27</b>
<b>CHAPITRE IV</b>	<b>PROTOCOLES DE LA THÉRAPIE GÉNIQUE ANTI-HIV</b>
<b>IV.1 POURQUOI S'ORIENTER VERS LA THÉRAPIE GÉNIQUE.....</b>	<b>29</b>
<b>IV.2 LES STRATEGIES DE LA THERAPIE GENIQUE ANTI-HIV.....</b>	<b>29</b>
<b>IV.2.1 PREMIÈRE STRATEGIE : RENDRE LES LYMPHOCYTES RÉSSISTANTS.</b>	<b>29</b>
IV.2.1.1 Première approche : surexpression des interférons.....	29
IV.2.1.1.1 Interféron $\alpha$ .....	29
IV.2.1.1.2 Interféron $\beta$ .....	29
IV.2.1.1.3 Interféron $\gamma$ .....	30
IV.2.1.2 Deuxième approche : Introduction d'un gène codant pour une protéine anti- HIV.	30
<b>IV.2.2 DEUXIEME STRATEGIE : BLOQUER LE VIRUS HIV.....</b>	<b>31</b>
IV.2.2.1 Première approche: Inhibitions des fonctions régulatrices des protéines TAT et REV.	31
IV.2.2.2 Deuxième approche : Clivage des ARN viraux.....	31
IV.2.2.2.1 Les ribozyme.....	32
IV.2.2.2.2 Les ARN antisens.....	32
IV.2.2.2.3 Les ARN leurres.....	32
IV.2.2.3 Troisième approche : Neutralisation du virus par molécules solubles.....	32
<b>IV.2.3 TROISIÈME STRATEGIE : PIÉGER LE VIRUS.....</b>	<b>33</b>
<b>IV.3 AUTRES STRATEGIES .....</b>	<b>33</b>
IV.3.1 Le gène suicide.....	33
IV.3.2 Les cellules suicides.....	33
IV.3.3 Les anticorps intracellulaires.....	34
<b>IV.4 UNE TOUTE NOUVELLE DECOUVERTE .....</b>	<b>35</b>
<b>IV.5 MODELES ANIMAUX .....</b>	<b>35</b>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>37</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>38</b>

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure	Titre de la figure	Page
Figure (1.1)	<i>Structure du virus HIV</i>	4
Figure (1.2)	<i>Bilan représentant les rapports (génomme-protéine)</i>	6
Figure (1.3)	<i>Cycle de réplication du virus de l'immunodéficience humaine</i>	9
Figure (1.4)	<i>Courbe représentative de la charge virale durant les phases de l'infection</i>	9
Figure (1.5)	<i>Tests de détection des anticorps anti-HIV</i>	15
Figure (2.1)	<i>Structure de l'AZT</i>	18
Figure (2.2)	<i>Structure de DDC</i>	18
Figure (2.3)	<i>Structure de DDI</i>	18
Figure (3.1)	<i>Structure d'un Rétrovirus</i>	23
Figure (3.2)	<i>Construction d'un Rétrovirus sauvage et d'un Rétrovirus recombinant</i>	23
Figure (3.3)	<i>Structure d'un Adénovirus</i>	24
Figure (3.4)	<i>Construction d'un Adénovirus recombinant</i>	25
Figure (3.5)	<i>Les vecteurs non viraux les plus utilisés</i>	26
Figure (3.6)	<i>Les méthodes envisagées en thérapie génique</i>	27
Figure (3.7)	<i>Les différentes étapes de la thérapie génique</i>	28
Figure (4.1)	<i>Mode d'action du gène suicide</i>	34
Figure (4.2)	<i>Modèle animal</i>	36
Tableau (2.1)	<i>Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse</i>	19
Tableau (2.2)	<i>Les antiprotéases</i>	19

# ABBREVIATIONS

**AAV** : Associated-Adeno virus  
**ADA** : Adénosine désaminase  
**AIDS** : Acquired Immuno Deficiency Syndrom  
**AZT** : Azidothymidine  
**CAF** : CD8 Antiviral Factors  
**ELISA** : Enzyme Linked Immunosorbent Assay  
**ENV** : Enveloppe  
**GAG** : Antigen group  
**GP** : Glycoprotéine  
**HIV** : Human Immunodeficiency Virus  
**IFN** : Interféron  
**IL**: Interleukine  
**kDa** : Kilodalton  
**LTNP** : Long Term Non Progressors  
**MP** : Mono phosphate  
**POL** : Polymérase  
**PCR** : Polymerase Chain Reaction  
**RER** : Réticulum Endoplasmique Rugueux  
**REV** : Régulateur de l'Expression des Virions  
**RIPA** : Radio Immuno Precipitation Assay  
**RT** : Transcriptase reverse  
**SIDA** : Syndrome Immuno Déficience Acquise  
**SIV** : Virus d'Immunodéficience Simienne  
**TAT** : Transactivateur  
**TAR** : Transactivateur responsif  
**TP** : Triphosphate  
**VIF** : Viral Infectivity Factor  
**VIH** : Virus d'Immunodéficience Humaine  
**VLM** : Virus de la Leucémie Murine

# INTRODUCTION

Le SIDA est la plus importante épidémie mondiale depuis la peste noire du moyen âge. On peut estimer que le nombre de décès directement lié au SIDA dépassera celui de la deuxième guerre mondiale pourtant bien meurtrière, mais c'est le tiers monde qui payera le prix le plus fort (1).

Depuis son introduction en 1981, le SIDA est traité à l'aide d'une combinaison de trois médicaments ou plus qui s'appelle: la thérapie de combinaison (2).

Ce traitement d'un grand bénéfice, se heurte à des difficultés liées aux résistances acquises par le virus HIV ou à des effets secondaires (3).

L'absence actuelle de médicaments efficaces contre cette maladie a fait s'orienter vers un nouveau mode thérapeutique: **la thérapie génique** (4). Cette technologie est basée sur la modification génétique des cellules humaines en leurs introduisant un gène d'intérêt thérapeutique (5).

Les travaux dans ce domaine n'ont cessé d'évoluer et on peut citer à cet effet les principaux grands groupes pharmaceutiques privilégiant la thérapie génique comme moyen de lutter contre le SIDA:

- Genetic Therapy (Etats-Unis)
- Somatix (Etats-Unis)
- Transgène (France)
- Viagène (Etats-Unis)
- Targeted Genetics (Etats-Unis) (6).

Alors, à la lumière de ce qui précède, que peut apporter avantageusement la thérapie génique aux sujets sidéens ?

# CHAPITRE I

## Généralités

## 1. DÉFINITION

Le mot SIDA est un sigle qui signifie Syndrome Immuno Déficience Acquis, cette maladie est provoquée par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) en « Anglais (HIV) », caractérisé par une déficience du système immunitaire qui facilite les infections par divers micro-organismes (bactéries, champignons, parasites) et l'apparition de certains cancers –maladies dites « opportunistes »- car elles atteignent peu les sujets dont l'immunité est normale (7).

Le Sida est aujourd'hui considéré comme une pandémie ayant fait selon l'ONU SIDA et l'OMS environ 25 millions de morts depuis 1981 jusqu'au Janvier 2006.

Il est estimé qu'environ 1% des personnes âgées entre 15 et 49 ans vivent avec le virus HIV, principalement en Afrique sub-saharienne (8).

## 2. HISTORIQUE DE LA MALADIE

En 1980, une première alerte a été décrite par Gottlieb à Los Angeles chez trois malades tous homosexuels présentant un amaigrissement, une candidose buccale et une pneumopathie à pneumocystis carinii (5).

C'est en Juin 1981 à Atlanta, au siège des CDC (« Centre Of Disease Control », l'agence fédérale américaine chargée de surveiller les maladies), que sont décrits 31 cas identiques toujours chez des homosexuels. Cette maladie jusqu'alors inconnue (9). Un cas similaire est également découvert en France. A la fin de 1981, la maladie a un nom en Anglais AIDS (Acquired Immuno-Deficiency Syndrome) et en Français SIDA (Syndrome Immunodéficientaire acquis).

Deux ans après l'identification du SIDA, Luc Montagnier et son équipe mettent en culture et étudient des globules blancs (lymphocytes) prélevés sur un ganglion cervical d'un homme atteint du SIDA (10), alors que les équipes américaines de R.Gallo et M.Essex s'égarèrent sur la piste des virus HTLV-1 (Human T-Cell Leukemia Virus type 1)

En 1985, les premiers tests sérologiques de dépistages de cette affection sont mis sur le marché.

En 1986, des chercheurs français de l'institut Pasteur de Paris, de l'hôpital Claude Bernard et des chercheurs Portugais de Lisbonne ont isolé un deuxième virus responsable du même syndrome appelé HIV-2(5).

Enfin, Robert Gallo annonce sa découverte au cours d'une conférence de presse qui a fait un grand bruit, et où l'institut Pasteur est oublié. Les virus découverts se révélant finalement identiques, l'institut Pasteur engage un procès qui débouche, en Mars 1987, sur un accord de partage des retombées financières entre l'institut Pasteur et l'institut national de santé (11).

### 3. VIRUS RESPONSABLE : LE HIV

#### 3.1 ORIGINE

Le virus du sida fait partie des virus qualifiés d'émergents : il est en effet apparu dans les populations humaines au cours du 20<sup>ème</sup> siècle - probablement avant la fin des années 1950 - l'épidémie s'étant déclarée, selon les régions du monde, entre la fin des années 1970 et le début des années 1990. On pense que le VIH dérive de rétrovirus présent chez des singes africains, dont des mutations auraient permis le franchissement de la barrière des espèces et l'infection de l'espèce humaine. Les premières contaminations se seraient faites par le biais de morsures des populations en contact avec les singes, ou par coupures lors de la préparation de viande de brousse. Il existe en effet, chez une trentaine d'espèces de singes africains, divers rétrovirus voisins du VIH, appelés VIS (virus de l'immunodéficience simienne). Au Gabon et en République démocratique du Congo, les chimpanzés sont ainsi porteurs d'un SIV très proche du VIH-1, tandis que les mangabéys d'Afrique de l'Ouest sont infectés par un virus similaire au VIH-2 (12).

#### 3.2 CLASSIFICATION CLASSIQUE

Règne: Virus  
Groupe: Groupe VI (ssRNA-RT)  
Famille: Rétroviridae  
Sous-famille : Orthrétrovirinae  
Genre: Lentivirus  
Espèce: type1 (HIV-1)  
          type2 (HIV-2) (13).

#### 3.3 CARACTÈRES GÉNÉRAUX

- Le virus HIV est un micro-organisme de 10 fois plus petit qu'une bactérie : son diamètre est de 100 à 120 nanomètre (1 / 10000 mm), il est de forme sphérique.
- C'est un virus à ARN.
- Deux souches du HIV ont été identifiées à ce jour :  
le virus de l'immunodéficience humaine de type 1, plus répandu et celui du type 2, moins virulent et principalement retrouvé en l'Afrique de l'ouest.
- Il possède une enzyme appelée Transcriptase Reverse, qui transcrit dans le cytoplasme de la cellule hôte l'ARN en ADN.
- Il a un tropisme particulier pour les lymphocytes T4 (en raison probablement d'une interaction entre son enveloppe et une protéine de la membrane du lymphocyte) et les monocytes- macrophages (qui permettrait sa transmission directe au lymphocytes T et expliquerait son neurotropisme).
- Ce virus est caractérisé par une variabilité génétique, il varie d'un patient à l'autre et même à des temps différents chez un même individu. Cette variabilité génétique est loin d'être constante tout au long du génome (14).
- Le virus HIV est relativement fragile même s'il résiste au froid, aux rayons X, aux ultraviolets et la sécheresse. Le virus est tué à une température de 56° pendant 30

minutes, par l'alcool au moins 50° pendant 10 minutes, par formol à 0,5% pendant 10 minutes, l'eau de Javel (12° chloro) à 1/1000 tue le virus HIV après 10 minutes (15).

### 3.4 STRUCTURE DU HIV

Le virus du SIDA, ou VIH (virus de l'immunodéficience humaine), est constitué, de l'extérieur vers l'intérieur, d'une enveloppe issue de la membrane de la dernière cellule infectée par ce virus, d'une capsid (coque de protéines), et d'un matériel génétique sous forme de deux brins d'ARN séparés, associés notamment à des molécules d'une enzyme appelée « transcriptase inverse » (11).

L'enveloppe du VIH porte des protéines spécifiques, plus précisément des glycoprotéines. Les glycoprotéines 120(gp120) sont des molécules de surface permettant la reconnaissance et la fixation du VIH à ses cellules-cible (lymphocytesT-CD4 et macrophages), par l'intermédiaire des récepteurs CD4 de celles-ci. Les glycoprotéines 41(gp41), qui traversent l'enveloppe de part en part, permettent quant à elles, après la fixation, à l'enveloppe du virus de fusionner avec la membrane de la cellule-cible.

La capsid est une coque de protéine qui renferme le matériel génétique et qui s'ouvre lors de la fusion du virus avec sa cellule-cible, pour libérer le génome viral dans le cytoplasme de cette dernière (fig.1.1).

A l'intérieur de la capsid, les deux copies d'ARN simple brin qui constituent le matériel génétique du virus sont associées à une enzyme appelée « transcriptase inverse » ou « reverse transcriptase » (16).

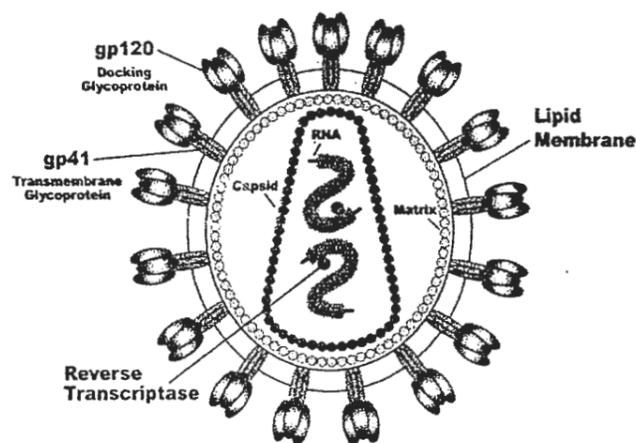


Figure 1.1 : structure du virus HIV (11).

### 3.4.1 Le génome du HIV

L'ARN viral contient l'information génétique nécessaire à la synthèse des protéines virales, a une longueur de 9600 nucléotides, il est constitué d'au moins trois régions appelées : gag, pol et env.

#### 3.4.1.1 Les gènes gag, pol et env

Ce sont des gènes classiques de tous les rétrovirus.

**Gag** : contient l'information nécessaire à la synthèse des protéines de capsid ainsi des protéines majeures et protéines liées à l'ARN en particulier p25, p18, p13, dérivées du gène gag par un précurseur commun).

**Pol** : code pour les protéines de réplication de la transcriptase inverse et l'intégrase, et pour une protéase nécessaire à la maturation des protéines de gag.

**Env** : C'est un gène codant pour les protéines d'enveloppe, ces protéines sont désignées par l'abréviation p (protéine) ou gp (glycoprotéine) suivie de leur poids moléculaire en kilo daltons (kDa). Ce gène produit une protéine de 90 kDa, précurseur qui subit une glycosylation portant sa masse moléculaire relative à environ 160 kDa.

Comme pour tous rétrovirus, ce précurseur est ensuite clivé par une protéase cellulaire au niveau d'un site riche en acides aminés basiques pour donner naissance à une glycoprotéine externe ou de surface (gp120), et à une glycoprotéine transmembranaire gp41, cette dernière possède une région très riche en acides aminés hydrophobes qui l'ancre à la membrane cellulaire phospholipidique.

La gp 120 interagit à très haute affinité avec la glycoprotéine CD4 (ou T4), qui se trouve à la surface des lymphocytes auxiliaires ou « helper ». La protéine CD4 constitue le récepteur qui permet l'accès spécifique du virus à sa cellule cible. Cet aspect moléculaire explique schématiquement le déficit T4 associé au sida.

#### 3.4.1.2 Les gènes supplémentaires

- **Les gènes régulateurs TAT et REV :**

- **Le gène TAT** : ce qui signifie « transactivateur », augmente le niveau global de la synthèse des protéines virales. TAT est une protéine en forme de « doigt », stabilisée par un atome de zinc. Cette structure lui permet de se lier à l'ARN viral au niveau d'une séquence appelée TAR (transactivateur responsif) située à une extrémité du génome viral.

- **Le gène REV** : ce qui signifie « régulateur de l'expression des virions », augmente de façon préférentielle le niveau des ARN messagers correspondant aux seules protéines gag, pol, et env. Sous l'action de Rev, l'augmentation de la quantité de ces protéines « structurales » s'effectue conjointement à la diminution de protéines régulatrices du HIV.

• **Le gène VIF** : ce qui signifie «Viral Infectivity Factor », la fonction de cette protéine cytoplasmique de 23KD est mal connue aujourd’hui. Elle semble intervenir au niveau de la maturation des virions, qui perdent leur infectiosité lorsqu’ils sont mutés dans le gène vif.

• **Le gène NEF** : il est responsable de l’internalisation du CD4, provoquant la perte de la fonction immunitaire du lymphocyte. Les virus ne produisant pas Nef sont observés chez les « non progresseurs », individus infectés mais n’atteignant pas le stade sida (17).

Le bilan ci-dessous indique les rapports entre le génome et les protéines :

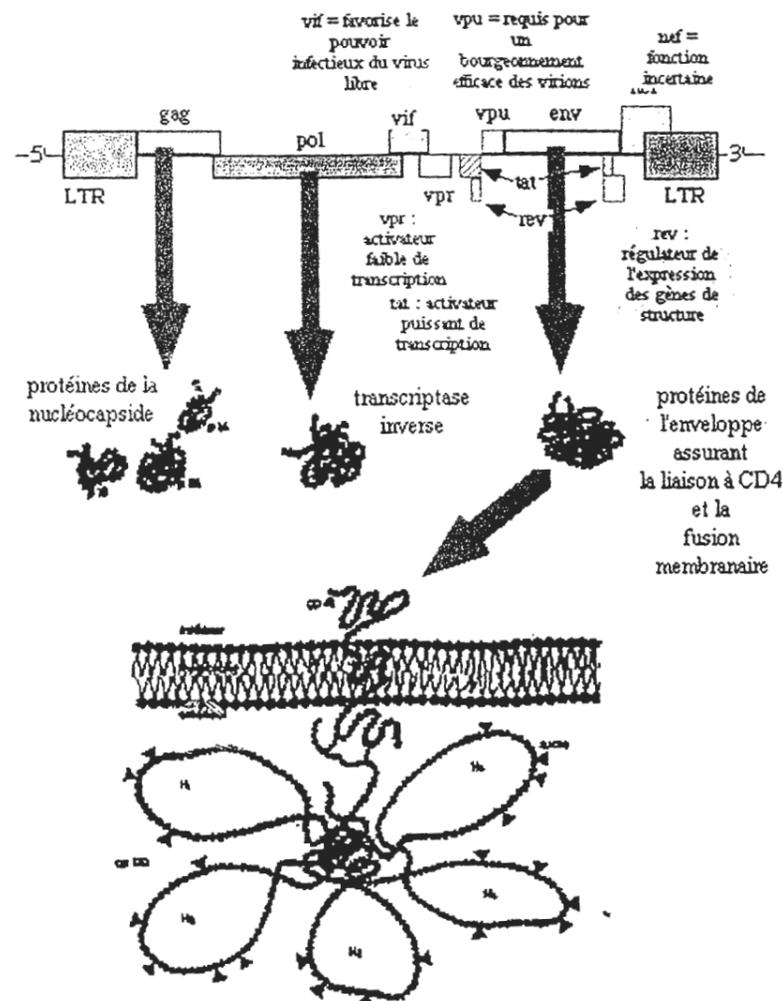


Figure 1.2: bilan représentant les rapports (génomme-protéines) (2).

### 3.5 MODE D’ACTION DU HIV

Le VIH pénètre dans l’organisme, par voie sexuelle ou sanguine. A sa surface, les protéines virales reconnaissent les récepteurs CD4+ et CD8+ des lymphocytes T, et s’y fixent. Ces cellules sont des acteurs clés de notre système immunitaire, et représentent également la cible privilégiée du VIH. Le virus fusionne alors sa membrane avec celle de la cellule, afin de faire entrer son matériel génétique et ses enzymes. Intégrant son génome au génome de la cellule, il utilise la machinerie cellulaire de son hôte pour

fabriquer de nouveaux virions. Ces nouveaux virus sont ainsi libérés dans l'organisme et peuvent infecter d'autres cellules. Cette prolifération se fait au détriment des lymphocytes, dont le nombre chute, car ils meurent à la suite de la libération des virions. Au cours de leur infection, ces cellules expriment à leur surface des peptides viraux.

Lorsque le taux de lymphocytes a atteint un seuil critique, les défenses immunitaires ne sont plus efficaces et il y a apparition de maladies dites opportunistes, le SIDA est déclaré. L'organisme n'est alors plus capable de lutter face à ces maladies (5).

### 3.6 LE CYCLE DE RÉPLICATION DU VIRUS HIV

Les cellules cible du virus de l'immunodéficience humaine sont essentiellement les lymphocytes TCD4+ mais aussi à un niveau moindre les monocytes-macrophages, les cellules dendritiques, les cellules de langerhans et les cellules microgiales cérébrales. La réplication virale a donc lieu dans de nombreux tissus (ganglions lymphatiques, intestin, cerveau, thymus). Les organes lymphoïdes, en particulier les nœuds lymphatiques (ou ganglions), constituent les principaux sites de réplication du virus. Le virus est présent dans de nombreux liquides biologiques, en particulier le sang et les sécrétions génitales (18). Ce virus se transmet par les contacts sanguins (toxicomanie, blessures, autrefois la transfusion sanguine,...) et sexuels (hétérosexuels et homosexuels). La transmission de la mère contaminée à l'enfant est également possible durant la grossesse, pendant l'accouchement et pendant l'allaitement, mais non systématique.

La réplication du virus se déroule en plusieurs étapes : (fig.1.3)

- **La fixation** : c'est la première étape dans l'infection de la cellule par le virus de l'immunodéficience humaine. Celle-ci repose sur une reconnaissance entre les protéines de surface du virus, les gp120 et les gp41, et les récepteurs de la cellule cible (les CD4+). Cette reconnaissance ne peut être opérée sans l'aide de co-récepteurs propre à la cellule infectée : pour les macrophages ce sont les CCR5 et pour les TCD4 ce sont les CXCR4 qui agissent avec la protéine de surface. Les macrophages et les TCD4 ont leur récepteur principal en commun. Cette reconnaissance est impérative pour que le virus puisse pénétrer dans la cellule et poursuivre l'infection. Il y a formation de ponts disulfure entre la gp120 et les CD4 de manière à ce que la liaison s'établisse. Cette formation implique la nécessité d'un milieu oxydant. L'utilisation de récepteurs autres que le CD4 est aussi observée, entre autres chez les cellules dendritiques (19).
- **La pénétration** : est la seconde étape de l'infection : le virus de l'immunodéficience humaine a été reconnu par les récepteurs et pénètre dans la cellule. La membrane lipidique et la membrane cellulaire fusionnent. Uniquement protégées par deux couches superposées (matrice et capsid), les ARN génomiques et les protéines associées vont alors pénétrer dans le cytoplasme de la cellule.
- **La décapsidation** : le virus se sépare de ces deux couches protectrices. Les deux copies du génome viral se retrouvent libres dans le cytoplasme, mais demeurent y associées plusieurs protéines nécessaires à la poursuite du cycle (20).

- **La transcription inverse** : chacun des ARN viraux est associé à une RT polymérase, enzyme assurant la synthèse d'un brin d'ADN à partir de l'ARN viral. L'information du virus est donc maintenant sous la forme d'ADN, intégrable dans le génome cellulaire.
- **L'intégration** : l'ADN pénètre dans le noyau. Une fois à l'intérieur, il s'insère dans le programme génétique de la cible sous l'effet de l'enzyme intégrase.
- **La formation d'un ARN messenger** : les deux brins d'ADN de la cellule « s'écartent » localement sous l'effet de l'ARN polymérase. Des bases azotées libres du noyau viennent prendre la complémentarité de la séquence et se polymérisent en une chaîne monobrin : l'ARNm (messenger).
- **L'épissage** : L'ARNm ainsi obtenu est hétérogène. En effet, il est constitué d'une succession d'introns (parties non codantes) et d'exons (parties codantes). Cet ARNm doit subir une maturation pour pouvoir être lu par les ribosomes. Se passe alors une excision des introns, pour ne laisser que les exons.
- **La traduction de l'ARNm** : Une fois sorti du noyau par l'un des pores nucléaires, l'ARNm est lu par les ribosomes du RER (réticulum endoplasmique rugueux). L'ARNm vient en fait se glisser entre les deux sous unités du ribosome. Pour chaque codon (groupe de trois nucléotides) de l'ARNm, le ribosome attribuera un acide aminé. Ceux-ci se polymériseront au fur et à mesure de la lecture. Un codon initiateur AUG (Adénine-Uracile-Guanine) fera débiter la synthèse tandis qu'un codon stop (UAA ; UGA ; UAG) en marquera la fin.
- **Maturation dans l'appareil de Golgi** : Les polypeptides ainsi formés ne sont pas encore opérationnels. Ils doivent subir une maturation dans l'appareil de Golgi.
- **L'assemblage** : Les protéines de structure du virus (matrice, capsid et nucléocapsid) sont produites sous forme de polyprotéines. Lorsqu'elles sortent du Golgi, les différentes protéines sont liées entre elles. Les protéines sont transportées à la membrane où elles rejoignent les glycoprotéines virales membranaires. Des ARN viraux rejoignent les protéines virales. Les protéines de structure s'assemblent pour former la capsid et la matrice, englobant cet ensemble.
- **Le bourgeonnement** : La capsid sort de la cellule infectée en arrachant une partie de la membrane cellulaire (à la quelle ont été préalablement fixées les protéines virales de surface (gp120 et gp41)).
- **La maturation des virus** : Une protéase virale doit cliver les liens qui unissent les différentes protéines de structure (matrice, capsid et nucléocapsid) pour que les virions soient infectieux. Suite aux clivages, les virions sont prêts à infecter de nouvelles cellules (21).

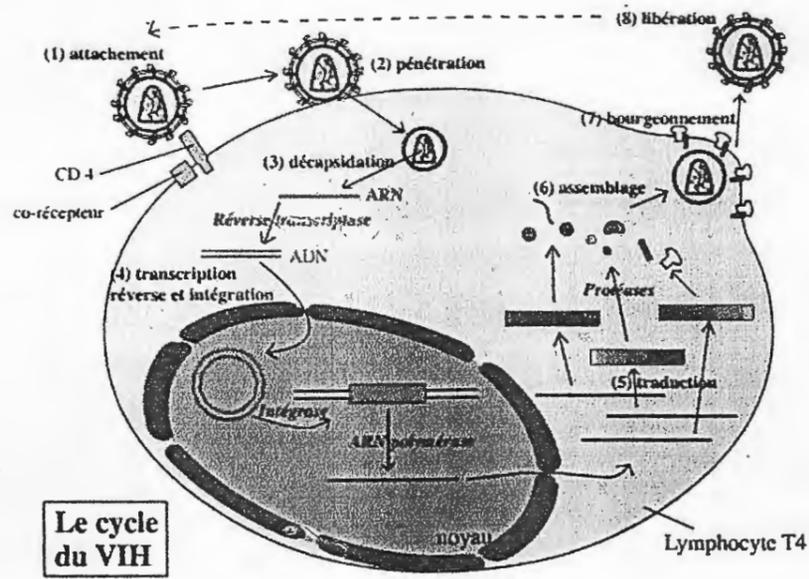


Figure 1.3 : cycle de réplication du virus de l'immunodéficience humaine (6).

4. EVOLUTION DE L'INFECTION :

L'infection par le VIH évolue sur plusieurs années. L'amélioration des connaissances et des possibilités de prise en charge s'est traduite par un allongement de la période qui précède la survenue du sida. Cette infection se résume en trois voire même quatre phases successives dont la durée (approximative) varie d'un individu à l'autre (11).

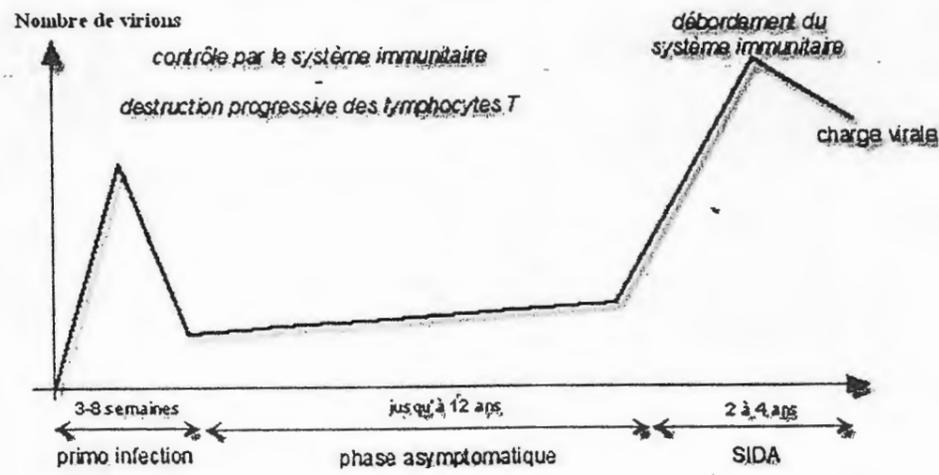


Figure 1.4 : courbe représentative de la charge virale durant les phases de l'infection (2).

## 4.1 LES SIGNES CLINIQUES SUIVANT LES PHASES DE LA MALEDIE

### 4.1.1 PRIMO -INFECTION

La primo-infection suit le contact avec le virus. Pendant cette première phase, l'organisme synthétise des anticorps spécifiques contre le VIH. Cette phase passe le plus souvent inaperçue. Quand les virus existent, les symptômes, non spécifiques, sont similaires à ceux d'une grippe ou d'une mononucléose infectieuse : fatigue, fièvre, maux de tête, augmentation des ganglions cervicaux...

La phase de primo-infection correspond à la période de quelques semaines qui suit immédiatement la contamination par le HIV. Elle se traduit par une multiplication importante de ce dernier, mais le système immunitaire n'est pas encore altéré. La virémie augmente de façon considérable. Quelques rares personnes (moins de 1% de la population) semblent résistantes à la contamination par le HIV due à une protection qui serait liée à une mutation d'un récepteur présent sur les lymphocytes, le CCR5 (19).

### 4.1.2 PHASE ASYMPTOMATIQUE :

C'est une phase dépourvue de symptômes (bien que le virus continue de se multiplier et de progresser), au cours de la quelle l'immunité est peu altérée, voire normale, et qui en l'absence de traitement, dure de six à sept ans, parfois jusqu'à dix ans. Le système immunitaire lutte contre le virus, ce qui fait dans un premier temps chuter la virémie, puis la maintenir à un taux relativement faible. Le système immunitaire compense la destruction des lymphocytes TCD4 en fabriquant de nouveaux lymphocytes, d'où une stabilité apparente du taux des lymphocytes CD4 ou T4 sanguin. Mais au bout de quelques années, le virus prend le dessus, le nombre total de lymphocytes diminue car le système immunitaire n'est plus en mesure de les remplacer, et la quantité de virus dans l'organisme (sang et ganglions) croît rapidement, marquant la fin de la phase asymptomatique (22).

Chez une faible proportion de la population générale (estimée entre 2% et 5%), la phase asymptomatique se poursuit au-delà de dix ans (les individus concernés sont qualifiés de Long Term Non Progressors, ou LTNP). Le système immunitaire de ces individus produit des molécules groupées sous le nom de CAF (CD8 Antiviral Factors), qui inhibe la réplication du virus dans l'organisme. Une équipe de chercheurs américains a identifié ces CAF dans le courant de l'année 2002 : il s'agit de protéines appelées alpha - défensines 1,2 et 3 (11).

### 4.1.3 PRÉ – SIDA ET SIDA DÉCLARÉ

Le pré – sida correspond à l'apparition des premiers symptômes, notamment un amaigrissement et une augmentation de volume des ganglions lymphatiques. Le taux de lymphocytes T CD4 dans l'organisme est en diminution.

Lorsque débute le sida déclaré, les ganglions et le système immunitaire, trop altérés par l'infection, ne sont plus capables de remplir leur fonction de défense de l'organisme, et le nombre de lymphocytes T CD4 ne cesse pas de chuter, tandis que la virémie augmente. L'effondrement des défenses immunitaires entraîne l'apparition d'infections opportunistes d'une part, d'affections tumorales (dont le sarcome de Kaposi et divers

lymphomes) et d'affections du système nerveux central d'autre part, l'ensemble de facteurs conduisent au décès du malade (23-11).

#### 4.2. LA MALADIE CHEZ L'ENFANT

Chez l'enfant, la maladie peut évoluer sous deux formes :

-Une forme lente correspondant à une infection au moment de l'accouchement, semblable dans sa forme à l'infection chez l'adulte et qui concerne la plus part des enfants séropositifs.

- Une forme rapide correspondant in utero. Elle se déclare dès l'âge de 3 mois ; le VIH se réplique d'une manière exponentielle et est susceptible d'induire des lésions multiples caractérisées par des troubles neurologiques graves, des troubles pulmonaires et respiratoires à évolution progressives ou brutales, des lymphomes ou un cancer, le risque d'évolution précoce est plus élevé lorsque la maladie maternelle est à un stade avancé lors de l'accouchement (5).

#### 5. TRANSMISSION DE LA MALADIE

Le HIV se transmet par le sang et les sécrétions sexuelles. la sueur, la salive, l'urine et les selles ne sont pas contaminants, le virus y étant présent en trop faibles quantités. Aucun cas de transmission par la salive n'a ainsi été démontré, et certaines études avancent qu'il faudrait boire 12 l de salive pour contracter le virus. Celui-ci ne peut pas survivre longtemps en dehors de l'organisme. Les contacts de la vie quotidienne, le partage des verres et couverts, les postillons, les poignées de porte, le linge, les téléphones publics ou les sièges de toilettes sont sans risque. Les animaux domestiques ne transmettent pas le sida, pas plus que les piqûres de moustiques (24).

On peut constater trois voies de transmissions :

##### 5.1. VOIE SANGUINE

Les échanges des seringues usagées chez les consommateurs de drogues injectables représentent un mode majeur de transmission du sida (les virus présent dans une goutte de sang contaminée à l'intérieur d'une seringue sont protégés de l'air et peuvent survivre longtemps, et donc infecter un nouvel utilisateur de la seringue).

En ce qui concerne les transfusion sanguines, la transfusion du sang total non chauffé constitue un vecteur de transmission du virus. Ce risque de transmission est éliminé, car depuis Août 1985, le dépistage systématique du HIV est effectué sur chaque don de sang ; de plus un entretien préalable du donneur avec un médecin précède tout don de sang, de façon à exclure d'emblée les sujets potentiellement contaminés. Enfin, l'inactivation virale des dérivés du plasma est systématique. Le don de sang ne présente quant à lui aucun risque, le matériel de prélèvement utilisé étant stérile et à usage unique (15).

Un autre risque de contamination par voie sanguine est l'accident chez les professionnels de santé, notamment par piqûre ou coupure avec du matériel contaminé (aiguille, scalpel...).

Enfin, l'utilisation des brosses à dents, coupe-ongles, ciseaux, rasoirs des personnes contaminées comporte un risque, certes minimes mais qui impose la prudence. Il en est même pour les aiguilles utilisées pour le tatouage, les instruments de chirurgie dentaire et

les aiguilles d'acupuncture. La stérilisation systématique après chaque utilisation ou l'emploi de matériel à usage unique supprime tout risque de contamination (5-15).

## 5.2. VOIE SEXUELLE

Chez les personnes séropositives, le virus du sida est présent dans toutes les sécrétions sexuelles : sperme, liquide séminal et sécrétion vaginales. Toute relation sexuelle non protégée avec un partenaire de sérologie inconnue est donc potentiellement contaminante. Les périodes de menstruation de la femme augmentent le risque de transmission, le virus étant présent dans le sang menstruel.

Les dons de spermes non contrôlés sont également un mode de transmission potentiel du HIV. En France par exemple, ce risque est supprimé depuis 1992, et des précautions rigoureuses sont prises dans les centres d'études et de conservation des œufs et du sperme (CECOS). Le sperme du donneur est dans un premier temps congelé, puis, six mois plus tard, le donneur est convoqué pour subir de nouveaux tests de dépistage dont les résultats conditionnent le don. Si le donneur est séronégatif pour le HIV, le sperme est exploité pour une procréation médicalement assistée ; dans le cas contraire, il est systématiquement détruit, écartant ainsi toute éventuelle contamination (15).

## 5.3 TRANSMISSION TRANSPLACENTAIRE ET ALLAITEMENT

Le VIH peut se transmettre de la femme enceinte à son enfant, durant le troisième trimestre de la grossesse ou lors de l'accouchement. Ce risque de transmission varie de 15% à 30% si la mère ne suit aucun traitement, et est d'autant plus élevé que son état général est faible ou si son taux de TCD4 est inférieur à 200 cellules par mm<sup>3</sup>. Il est en revanche considérablement diminué si la mère suit un traitement antirétroviral pendant sa grossesse, pouvant chuter en dessous de 5%.

Un nouveau-né de mère séropositive est nécessairement positif au test de dépistage du VIH pendant les premiers mois de sa vie, car les anticorps de la mère passent dans le sang du fœtus pendant la grossesse. S'il n'a pas été contaminé par le HIV, il est seulement séropositif apparent : les anticorps maternels disparaissent définitivement après une période de neuf à dix-huit mois, et il devient alors séronégatif. En revanche s'il a été contaminé, il perd les anticorps maternels, développe ses propres anticorps anti-HIV et reste séropositif.

La transmission du VIH est également possible par le lait maternel (allaitement par une mère séropositive ou dons de lait). L'allaitement est donc contre-indiqué si la mère est séropositive. Le lait maternel doit être distribué exclusivement par les lactariums, pour les quels les donneuses de lait sont sélectionnées, le lait est en suite chauffé avant d'être distribué (11-15).

## 6. DEPISTAGE ET DIAGNOSTIC

### 6.1 DEPISTAGE

Le test de dépistage du VIH est conseillé à toute personne ayant été confrontée à une situation à risque (rapports sexuels non protégés, utilisation de seringue usagées, transfusion sanguine avant 1985) et aux couples désireux de cesser d'utiliser les préservatifs.

Plusieurs tests de dépistage ont été utilisés, les principaux sont :

#### 6.1.1 ANTIGÉNÉMIE P24

La recherche de l'antigène p24 (protéine d'enveloppe du VIH) n'a d'intérêt que pendant une période située environ entre le 15<sup>ème</sup> et le 25<sup>ème</sup> jour qui suivent une situation à risque. Elle est facile à réaliser, peu coûteuse, l'antigénémie p24 est disponible dans la plus part des laboratoires.

Son interprétation doit être prudente et, dans tous les cas, doit être confirmée par une recherche des anticorps anti-HIV (9).

#### 6.1.2 TESTS DE RECHERCHE D'ANTICORPS ANTI-VIH

Les principaux tests de recherche d'anticorps sont :

➤ **TEST ELISA** (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) :

C'est la méthode immunoenzymatique la plus utilisée, il existe deux types de test ELISA : une méthode directe et une autre indirecte.

**La méthode ELISA directe :** cette méthode est utilisée pour détecter les antigènes, elle se fait par l'adsorption de l'anticorps spécifique de l'antigène qu'on veut détecter sur la surface des puits de la plaque de microtage.

On ajoute un échantillon du patient à chaque puit, dans ce cas, si l'antigène est présent, il réagit spécifiquement avec l'anticorps adsorbé sur le puit alors que les autres antigènes sont emportés en lavant le puit. Après, on ajoute un second anticorps spécifique de l'antigène. On constate alors que ce dernier est pris en sandwich si ces deux anticorps réagissent avec lui.

La réaction est révélée par une enzyme, tel que la phosphatase alcaline conjuguée au second anticorps, les anticorps conjugués à l'enzyme et ne sont pas liés à l'antigène sont éliminés en lavant les puits.

En ajoutant le substrat d'enzyme, un changement de couleur s'opère qui permet de visualiser l'activité enzymatique. Le résultat est positif si l'antigène réagit avec les anticorps adsorbés au cours de la première étape.

Le résultat est négatif si l'antigène test n'est pas présent ou n'est pas spécifique de l'anticorps adsorbé sur la paroi des puits, dans ce cas, il ne reste pas lié et est emporté lors du lavage de la plaque (25).

**La méthode ELISA indirecte** : elle est utilisée pour détecter les anticorps.

En première étape, c'est un antigène connu plutôt qu'un anticorps qui est adsorbé sur les puits peu profonds de la plaque. On ajoute le sérum du patient aux puits, s'ils sont présents, les anticorps se lient à l'antigène adsorbé. Les anticorps qui n'ont pas réagi sont éliminés par le lavage des puits.

Les anti-immunoglobulines humaines qui ont été conjuguées à une enzyme réagissent avec les anticorps qui sont liées à l'antigène dans les puits.

Enfin, ces immunoglobulines humaines qui ne sont pas liées sont éliminées par un lavage et on ajoute le substrat de l'enzyme. La réaction enzymatique, révélée par un produit coloré a lieu dans les puits où l'antigène adsorbé s'est combiné avec l'anticorps présent dans l'échantillon de sérum (25).

➤ **WESTERN BLOT :**

C'est une technique plus précise et spécifique, car elle met en évidence les différents anticorps anti-HIV.

Il est indispensable de caractériser les différentes réactivités obtenues vis-à-vis des protéines virales pour affirmer ou non la spécificité du signal positif obtenu par ELISA (fig.1.5).

Les protéines virales (utilisées comme réactif) sont tout d'abord séparées par électrophorèse sur gel selon leur poids moléculaire. Un électrotransfert permet de faire passer ces protéines sur bandelettes de nitrocellulose.

Le sérum à tester est déposé sur ces bandelettes, la fixation des anticorps du sujet sur les antigènes de la bandelette est révélée par une réaction enzymatique colorée.

Les résultats sont rendus en (+) ou en (-), et en (+ +). Par exemple : pour HIV1, pour les anticorps correspondants aux protéines suivantes : gp160, gp120, p66, p55, p51, gp41, p31, p24, p17. Le sérum testé est fortement positif si toutes ces bandes apparaissent.

Un des problèmes d'interprétation est que les critères de positivité diffèrent selon les organismes nationaux. Pour certains CDC (« center disease control », Atlanta), un sérum considéré comme positif doit contenir au moins une bande d'enveloppe gp160/gp120 ou gp41 associé à une autre bande spécifique env gag ou pol, ainsi le sérum est considéré comme positif, celui qui a une bande gp160 et une bande p24 (+ ou - 55), et pour l'OMS (1990), il suffit que deux bandes d'enveloppes associées ou nom à une bande gag ou pol soient présentes.

Les résultats sont parfois difficilement interprétables, car les malades atteints de sida peuvent présenter des profils incomplets à certains stades de la maladie à cause de leur immunodéficience. Bien qu'un résultat positif soit en faveur d'une infection par le virus et le diagnostic ne peut être affirmé que par les signes cliniques.

Il existe des bandelettes destinées à la recherche des anticorps anti-HIV-1, et d'autres bandelettes pour la recherche des anticorps anti-HIV-2 (16-17).

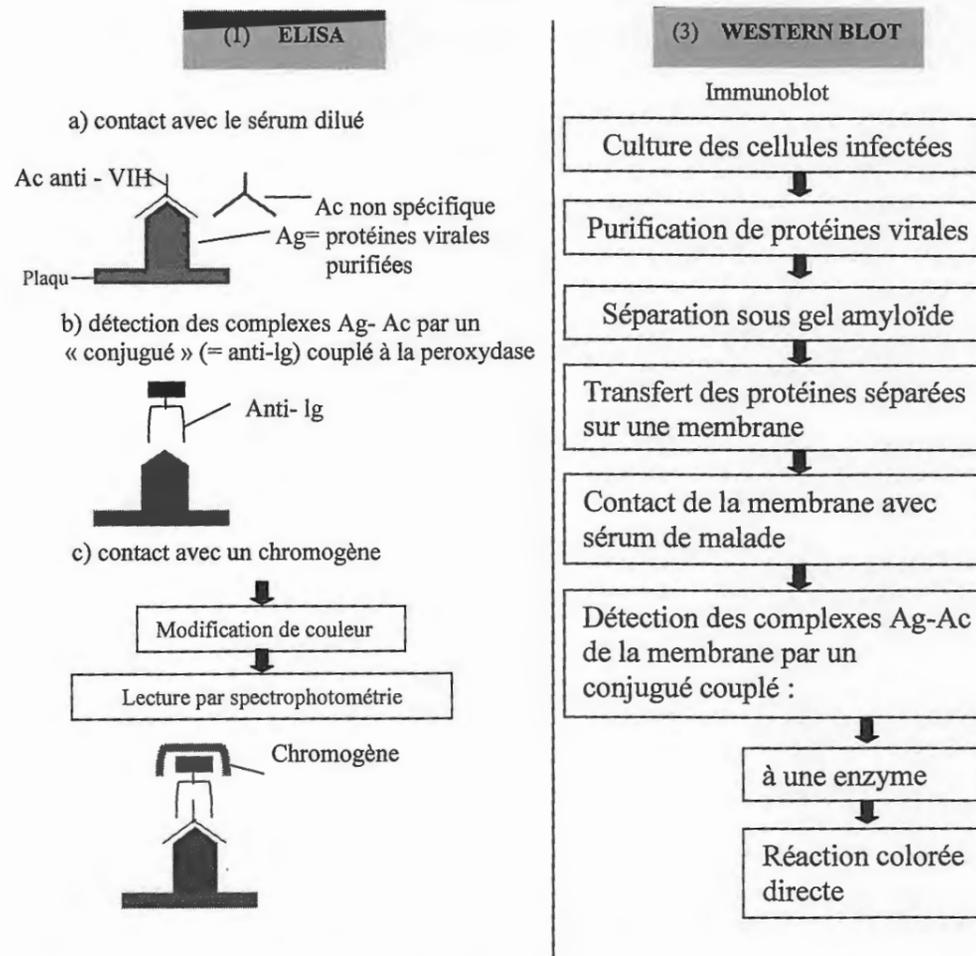


Figure 1.5 : tests de détection des anticorps anti-HIV (17)

### 6.1.3 TESTS DE RECHERCHE DU VIRUS

➤ **LE RIPA** (Radio Immunoprecipitation Assay) : C'est un test réservé aux laboratoires spécialisés, car il implique la culture de cellules infectées et l'utilisation de molécules radioactives pour le marquage du virus (20).

➤ **LA CULTURE VIRALE** : C'est une technique longue et très onéreuse. Elle consiste en la mise en culture de lymphocytes T. Si ceux-ci produisent des virus, ils pourront être détectés dans les produits de culture surnageants. Pour des raisons de sécurité, la culture virale implique des dispositions particulières. Ce procédé permet d'isoler des souches nouvelles, d'évaluer la charge virale dans le suivi de protocoles thérapeutiques, ou de diagnostiquer l'infection par VIH chez le nouveau-né de mère séropositive (26).

➤ **LA PCR** (Polymerase Chain Reaction) : C'est une technique d'amplification de l'ADN qui consiste à extraire l'ADN des lymphocytes (l'ADN du VIH a en effet la particularité de s'intégrer à l'intérieur même de l'ADN des lymphocytes). Cet ADN est ensuite transféré dans un système d'amplification spécifique de l'ADN viral recherché pour le rendre décelable. On réserve ce procédé de la détection de l'ADN viral chez le nouveau-né de mère séropositive, pour distinguer la sérologie de celle de la mère séropositive (20).

➤ **LA MESURE DE LA CHARGE VIRALE** : C'est une technique qui permet de calculer la virémie (mesure de la concentration en ARN viral dans le plasma). Cette technique a ses limites, car elle estime les virus présents dans le sang et non dans les tissus. Plusieurs études confirment le lien entre la charge virale et le risque d'apparition de maladies opportunistes. En l'absence de traitement, plus la charge virale est élevée, plus le risque d'évolution de l'infection à VIH est important. Lorsque le traitement fait baisser la charge virale de manière importante et durable, le risque d'évolution de l'infection à VIH est nettement diminué. La charge virale doit être interprétée en fonction de présence ou non des symptômes et de l'état général ainsi du taux des TCD4. la charge virale peut augmenter de manière temporaire après un vaccin ou au cours d'une infection bénigne telle que la grippe ; elle retrouve sa valeur réelle après cet épisode (26).

#### 6.1.4 Tests mixtes: détection d'antigènes et d'anticorps

L'idée est d'associer les deux recherches pour permettre une détection plus sûre et surtout plus rapide : la détection d'un antigène viral est plus précoce que celle de l'anticorps. Le système VIDAS bioMérieux propose l'utilisation de cônes sensibilisés par des anticorps anti p24 et des peptides viraux. Les p24 ou les anticorps du sérum se fixent sur le cône, puis les anticorps de révélation marqués par PAL (anticorps anti p24 ou anticorps anti-anticorps humains) se fixent (sur la p24 fixée ou sur les anticorps du patients fixés) et assurent donc la détection par l'hydrolyse du substrat de la PAL.

## 6.2 LE DIAGNOSTIC

La première étape en est la positivité d'un test de dépistage, qui indique qu'il y a eu contamination par le virus. Par la suite, le diagnostic de SIDA déclaré est établi sur la base d'une part du nombre de lymphocytes T CD4 par millimètre cube de sang, De cette façon on peut distinguer trois catégories : supérieur ou égal à 500 cellules par  $\text{mm}^3$ , entre 200 et 499 cellules par  $\text{mm}^3$ , et inférieur ou égal à 200 cellules par  $\text{mm}^3$ , et d'autre part de l'apparition de maladies dites opportunistes (15).

## 7. LES MALADIES OPPORTUNISTES ASSOCIÉES AU SIDA

Les maladies opportunistes sont dues à des micro-organismes (virus, bactéries, champignons microscopiques), facilement jugulés par un système immunitaire qui fonctionne, mais pouvant exprimer leur virulence lorsque celui-ci est déficient. Il existe environ 25 maladies opportunistes du SIDA. Plusieurs d'entre elles sont très rares dans la population générale, mais peuvent toucher des patients atteints d'autres types de déficits immunitaires. Les principales sont : la pneumocystose, la candidose, la cryptosporidiose, la toxoplasmose, la tuberculose, l'infection à cytomégalovirus (CMV), l'infection à papillomavirus, le sarcome de Kaposi, les lymphomes, les atteintes du système nerveux central...etc (17).

# CHAPITRE II

## Stratégies thérapeutiques Anti-HIV

L'arsenal thérapeutique contre le HIV s'étoffe de jour en jour. Une vingtaine de médicaments antirétroviraux sont disponibles et ont pour but d'interférer sur différents mécanismes, d'une part sur deux enzymes nécessaires à la réplication du virus, et d'autre part sur les mécanismes d'entrée du virus dans la cellule.

## 1. LA CHIMIOTHÉRAPIE : (molécules antirétrovirales)

Elle consiste à utiliser des agents antirétroviraux qui s'opposent à la multiplication antivirale, elle a pour but d'empêcher l'une des étapes du cycle.

Le traitement antirétroviral est débuté lorsque les sujets ont des signes cliniques d'immunodépression ou lorsque le taux des lymphocytes TCD4+ est inférieur à 200 cellules par microlitre. Pour les sujets ayant un taux de lymphocytes TCD4+ entre 350 et 200 cellules par microlitre la charge virale HIV et la vitesse de la chute des lymphocytes seront pris en compte (12).

### 1.1 Les inhibiteurs de la transcriptase inverse :

Le HIV est un rétrovirus à ARN possédant une enzyme, la transcriptase inverse, qui transforme l'ARN viral en ADN, qui s'intègre dans l'ADN de la cellule-hôte. Les inhibiteurs de la transcriptase inverse ont pour but de faire fabriquer à cette enzyme des brins d'ADN altérés et non fonctionnels. Ils peuvent s'intégrer dans l'ADN de l'hôte, mais ne permettent plus la synthèse des protéines virales.

On peut classer ces inhibiteurs en trois classes :

#### 1.1.1 Les inhibiteurs nucléosidiques :

Ils constituent la première classe d'antirétroviraux, ils comprennent l'Azidothymidine (AZT) (**fig.2.1**), la Zalcitabine (ddc) (**fig.2.2**), la Didanosine (ddi) (**fig.2.3**), la Stavudine (d4T), la Lamivudine (3TC), l'Abacavir(ABC) et l'entricitabine(FTC). Ces composés sont tous neutres ou réducteurs à l'exception de l'AZT qui est un oxydant, les inhibiteurs de la transcriptase inverse peuvent cependant interférer avec la duplication de l'ADN de la cellule hôte au moment des divisions cellulaires (mitose), en particulier dans les cellules à divisions fréquentes comme celles de la moelle osseuse. Par ailleurs, l'utilisation de telles molécules entraîne l'apparition des souches virales résistantes (27).

**AZT** : abréviation d'azidothymidine, médicament le plus employé dans le traitement de l'infection par le HIV. Il a été découvert en 1985 que la zidovudine inhibe la réplication de l'HIV en gênant le processus de la transcription inverse qui donne de nouvelles particules de virus. Des essais cliniques effectués en 1986 ont montrés que l'AZT améliore la survie de patients atteints du sida en retardant sa phase finale. L'AZT a beaucoup de bénéfices, il semble ralentir temporairement la progression de la maladie au stade avancé du sida, mais aussi des manifestations précoces. Il semble efficace contre les atteintes neurologiques et la démence provoquées par le sida, car il traverse facilement la barrière hémato-encéphalique, ce qui n'est pas le cas d'autres médicaments apparus depuis.

Cependant, l'AZT provoque de graves effets secondaires tels que l'anémie et la perte de masse musculaire, surtout lorsqu'il est administré à des doses supérieures à 1000 mg par jour pendant de longues périodes. De plus, le traitement par l'AZT seul stimule

l'émergence de souches de HIV résistantes. Il semble que cette résistance se manifeste plus rapidement chez les patients ayant des taux élevés de virus sanguin, mais quelle puisse être freinée si l'AZT est administré en association avec d'autres médicaments antiviraux (16-27).

➤ La structure de l'AZT :

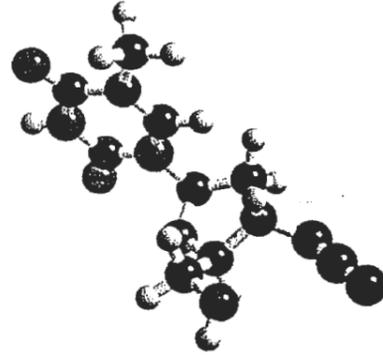
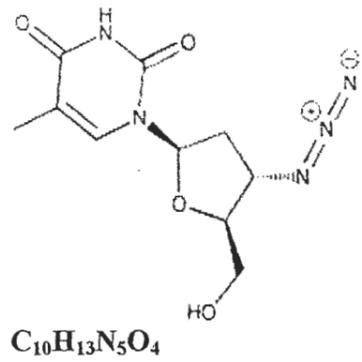


Figure 2.1: la structure de l'AZT (16).

➤ La structure de DDC :

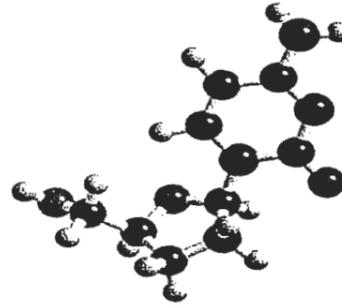
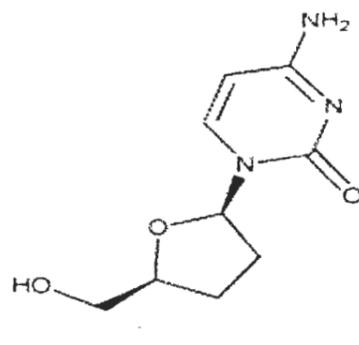


Figure 2.2 : la structure de DDC (16).

➤ La structure de DDI : Le DDI est un analogue de l'AZT.

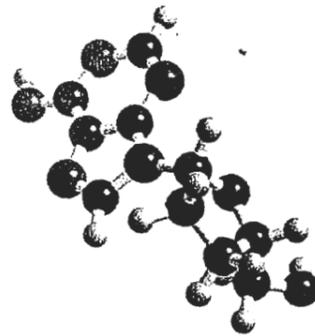
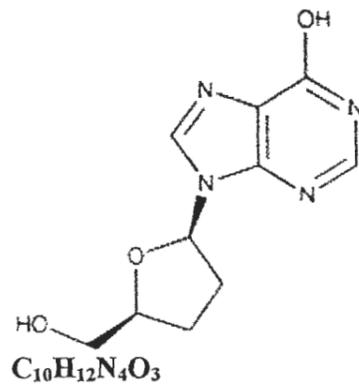


Figure 2.3 : la structure de DDI (16).

Tous ces produits ayant une action antirétrovirale doivent avoir un effet anti ADN polymérase le plus faible possible, afin de permettre une inhibition de la réplication de HIV sans altérer la croissance cellulaire.

### 1.1.2 Les inhibiteurs non nucléosidiques :

Ce sont des inhibiteurs puissants et très sélectifs de la transcriptase inverse de HIV. On trouve dans cette classe, la Névirapine et l'Éfavirenz, ils ne sont actifs que sur le HIV-1 et sont métabolisés en phénols par oxydation (27).

Le tableau suivant indique les effets secondaires de ces deux inhibiteurs :

**Tableau 2.1 : Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (5).**

Inhibiteurs	Présentation	Effets secondaires
Éfavirenz 600 mg/j	gel à 200g	Sensations vertigineuses, nausées, allergie, sinusites, diarrhée, syndrome grippal
Névirapine 400mg/j	Comprimé à 200mg	Allergie, fièvre, hépatotoxicité transaminase

### 1.2. Les inhibiteurs des protéases :

Les protéases synthétisées par le HIV sont des enzymes qui coupent les protéines virales nouvellement synthétisées en fragments fonctionnels et actifs.

Les inhibiteurs de protéase (antiprotéase) ont pour but d'empêcher le fonctionnement de cette enzyme et donc, indirectement de laisser inactives les nouvelles protéines virales : le virus ne peut pas aboutir à sa forme définitive. Ces molécules ne peuvent être utilisées en monothérapie et sont donc associées aux inhibiteurs de la transcriptase inverse. Au début du traitement, les inhibiteurs de la protéase peuvent entraîner des effets secondaires tels des nausées, des vomissements et des diarrhées. Ces effets secondaires disparaissent souvent après les premières semaines de traitement (27).

Le tableau suivant indique quelques antiprotéases et leurs effets secondaires:

**Tableau 2.2 : Les antiprotéase (5).**

DCI Spécialité Posologie moyenne	Présentations	Effets secondaires Surveillance biologique
<b>Ritonavir</b> Norvir 1000-1200mg/j	Gel à 100mg Sol buvable	Troubles digestifs, hépatotoxicité, diabète, neuropathie, NFS, transaminases, glycémie
<b>Viracept</b> Nelfinavir 2250mg/j	Comp à 250mg Poudre orale 50mg/1g	Troubles digestifs, diabète, transaminases, glycémie, CPK

### 1.3. Association d'antirétroviraux

De façon à retarder et à réduire l'apparition de souches virales résistantes et à améliorer l'efficacité du traitement, les antirétroviraux sont prescrits sous forme de combinaisons associant en général, deux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse, et un inhibiteur des protéases, ou à un inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse ou parfois à un troisième inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse « **Trithérapie** » (5).

## 2. PERSPECTIVES THÉRAPEUTIQUES ET VACCINALES

L'accumulation des connaissances sur le virus du SIDA et les recherches menées depuis sa découverte ont permis d'élucider les mécanismes de la maladie au niveau cellulaire et moléculaire et mettent au point des traitements antiviraux, ces derniers permettent de retarder l'apparition des complications et de prolonger la durée de vie pendant plusieurs années, mais aucun de ces médicaments ne permet de guérir du SIDA. Ceci fait orienter les chercheurs vers des nouvelles perspectives thérapeutiques à côté de ces traitements antiviraux classiques.

### 2.1 L'IMMUNOTHÉRAPIE

L'immunothérapie est l'une des voies les plus encourageantes elle a pour rôle de renforcer ou de stimuler le système immunitaire qui dispose naturellement de moyens de défense pour limiter la multiplication virale.

Plusieurs études ont montrées que le nombre des lymphocytes TCD4 va remonter chez la plus part des patients de façon importante et durable grâce à l'immunothérapie combinée avec les antirétroviraux.

Ainsi, les fonctions de ces lymphocytes TCD4 devraient en partie être restaurées, et les défenses immunitaires pourraient à nouveau protéger l'organisme face à certains agents pathogène. Ce qui permet à l'immunité naturelle de prendre alors le relais dans le cas où les personnes malades arrêtent ou réduisent leurs traitement antirétroviral lourd d'effets secondaires.

#### 2.1.1 L'interleukine - 2

A l'heure actuelle, les principaux résultats ont été obtenus avec *l'interleukine-2*. L'IL-2 est une cytokine qui joue un rôle central dans la régulation et l'activation des lymphocytes B et T. Plusieurs études in vitro ont montré que l'IL-2 était capable de restaurer certaines anomalies immunologiques liées à l'infection par le VIH. In vivo, l'IL-2 a une courte durée de vie. Dans l'infection par le VIH, elle a d'abord été administrée par voie intraveineuse mais elle est pratiquement aussi efficace par voie sous cutanée. Le principal résultat est une remontée progressive et durable des lymphocytes CD4 possédant une activité fonctionnelle. Ce résultat est surtout observé chez les patients ayant un déficit immunitaire modéré ( $CD4 > 200/mm^3$ ). L'augmentation de la réplication

virale initiale induite par l'IL-2 est minime, voire nulle, un effet bénéfique sur la charge virale à moyen terme a même été récemment suggéré. Les mécanismes d'action de l'IL-2 sont encore mal compris (28).

### 2.1.2 L'interféron $\alpha$

On sait que sous l'action de cette molécule biologique, les cellules produisent des protéines antivirales capables d'inhiber la synthèse des protéines virales et leurs assemblages.

En 1996, la société Interféron Science Inc. a mis sur pied des essais cliniques en vue de traiter des patients du SIDA par cet interféron.

## 2.2 La vaccinothérapie

La seule façon réaliste et efficace d'enrayer cette épidémie consiste probablement à utiliser un vaccin, mais malheureusement la mise au point de ce dernier se heurte de nombreuses difficultés et obstacles, parmi lesquels on compte: l'absence d'un hôte animal convenable qui manifeste les signes du SIDA, la grande variabilité génétique du virus d'un patient à un autre et même à des temps différents chez un même individu. (12).

Deux approches vaccinales principales sont développées : la première utilise des protéines d'enveloppe virale recombinantes intégrées à différents vecteurs viraux. C'est ce type de candidat vaccin qui est testé chez l'homme. Il permet d'obtenir chez le volontaire sain des anticorps neutralisants et une réponse cytotoxique.

La seconde approche consiste en une vaccination par des virions tués ou inactivés, cette approche est efficace dans le modèle du macaque (type de singe). Il sera plus difficile de faire l'essai chez l'homme d'une vaccination par un virus inactivé en raison des risques potentiels de recombinaison (29).

## 2.3 La thérapie génique :

L'absence actuelle de traitements efficaces contre le sida a fait s'orienter vers un nouveau mode thérapeutique moins conventionnel : la thérapie génique. Cette thérapie consiste à prélever des lymphocytes T des patients infectés, puis à les modifier par génie génétique de façon qu'ils reconnaissent et détruisent les cellules infectées par le HIV.

Enfin, on réinjecte les lymphocytes T modifiés dans la circulation sanguine du patient.

Cette stratégie sera étudiée en détails dans le chapitre suivant.

# Chapitre III

## La thérapie génique

### 1. DÉFINITION :

La thérapie génique est une nouvelle approche thérapeutique ou une tentative de traitement d'une maladie (infectieuse, génétique monogénique, cancéreuse ou autre...) par la modification génétique en utilisant les gènes comme médicaments.

Le principe de la thérapie génique consiste à introduire dans une cellule d'un patient dite cible, un matériel génétique (gène d'intérêt thérapeutique) afin qu'il produise une protéine manquante (cellule déficiente) ou un signal qui continuera à la mort cellulaire (cellule infectée ou cancéreuse) (2-7).

### 2. HISTORIQUE :

La maladie des enfants-bulles est causée par des mutations du gène codant l'adénosine désaminase (ADA), une enzyme indispensable au fonctionnement des lymphocytes. En son absence, les enfants atteints ont un système immunitaire tellement faible qu'ils doivent vivre à l'abri d'une bulle. En 1990, le médecin américain French Anderson choisit cette maladie pour le premier essai de thérapie génique chez l'homme. Le principe en est simple : prélever les lymphocytes des patients puis les réinjecter après y avoir introduit le gène sain codant l'ADA. L'état des deux fillettes retenues pour ce premier essai est amélioré par le traitement, bien qu'il ne soit pas certain que la thérapie génique en soit la cause, car le traitement médicamenteux n'avait pas été interrompu. Il faudra attendre le travail du Français Alain Fisher, pour cette nouvelle médecine. En 2000, employant une méthode comparable, pour que des enfants atteints de la maladie guérissent et sortent de leurs bulles. Entre-temps, le décès, en 1999, aux états unis, de plusieurs patients engagés dans des essais de thérapie génique avait tempéré l'enthousiasme (30).

### 3. LES CATÉGORIES DE LA THÉRAPIE GÉNIQUE :

Selon la nature de cellules infectées, on peut classer la thérapie génique en deux grandes catégories :

#### 3.1 La thérapie génique germinale :

Elle consiste à modifier les cellules germinales (cellules sexuelles reproductrices), ce qui signifie que les modifications génétiques subséquentes seront transmises à la descendance du patient.

#### 3.2 La thérapie génique somatique :

Elle consiste à introduire les gènes exclusivement dans des cellules somatiques (cellules non sexuelles comme les cellules de la peau, du cerveau, des muscles...).

Cette manipulation génétique n'affectera que l'individu chez lequel on a effectué ces changements. C'est à cette technique que se limite actuellement le champ d'activité et la recherche en thérapie génique.

**N.B :** Il convient de noter que même les techniques de la thérapie génique somatique les plus avancées n'ont encore qu'au stade des essais cliniques et que leur application générale n'a pas encore été approuvée (7).

4. LES OUTILS DE LA THÉRAPIE GÉNIQUE :

Pour incorporer le gène thérapeutique différents types de vecteurs sont utilisés en thérapie génique, tous d'abords les plus utilisés sont :

4.1 les vecteurs viraux

Les virus, sont des micro-organismes parasites des cellules, qui ont au cours de l'évolution biologique ont acquis la capacité de migrer et de pénétrer dans les cellules de certains organes et d'y introduire leur ADN dans les noyaux de ces cellules. L'utilisation en thérapie génique est possible car les gènes codant pour les protéines virales sont remplacés par le gène d'intérêt thérapeutique. On a donc pénétration dans la cellule de la même façon que le virus naturel. On aura la synthèse de protéines d'intérêt sans qu'il y ait production de particules virales.

Il faut de plus diminuer les réactions immunitaires. En effet il faut un pouvoir antigénique faible pour éviter toute activation du système immunitaire (les formations d'anticorps, la mobilisation des lymphocytes B et T, activation du complément...) (31). Parmi les vecteurs viraux on peut trouver :

4.1.1 Les rétrovirus :

Les rétrovirus sont les vecteurs choisis dans 37% des protocoles cliniques. Ils sont généralement dérivés des rétrovirus de la leucémie murine (MLV). Ce sont de petits virus enveloppés à ARN simple brin (fig.3.1). Pour leur utilisation en thérapie génique, ils sont délités de la région "gag-pol-env" codant pour les protéines enzymatiques et structurales (32) (fig.3.2).

Rétrovirus



Figure 3.1 : structure d'un rétrovirus (6).

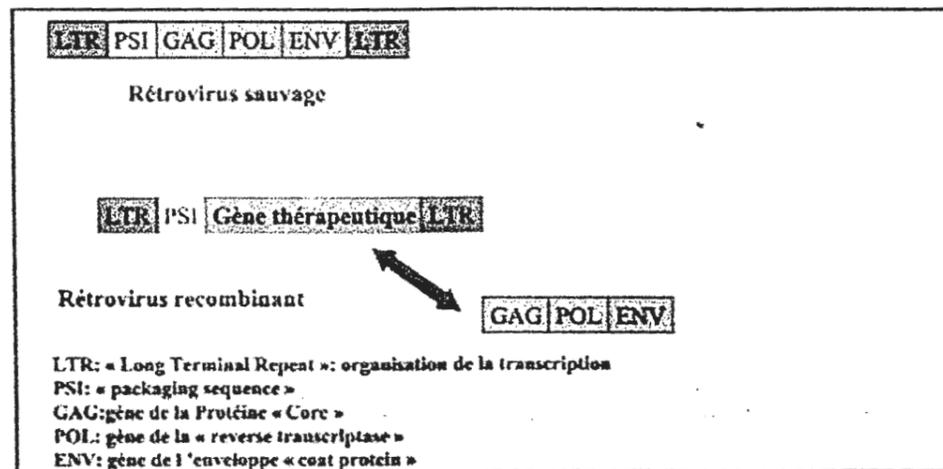


Figure 3.2: Construction d'un rétrovirus sauvage et d'un rétrovirus recombinant (6).

Les rétrovirus possèdent une propriété d'intégration obligatoire dans le génome de la cellule dans laquelle ils pénètrent, mais uniquement si celle-ci est en cours de division. Une fois le génome du virus intégré, la transcription du gène qu'ils portent peut fonctionner de manière autonome, si on lui a associé un promoteur spécifique.

Les avantages de ces virus sont :

- une grande efficacité d'intégration
- une stabilité d'expression, même après division de la cellule infectée.

Leurs inconvénients sont nombreux comme l'impossibilité d'infecter des cellules quiescentes ou à renouvellement lent (33).

#### 4.1.2 Les adénovirus :

Les adénovirus sont utilisés dans 20% des protocoles cliniques. Ce sont des virus à ADN bicaténaire de grande taille (36 kb) (fig.3.3), pour leur utilisation en thérapie génique, leur génome complexe est délété des régions nécessaires à la réplication (E1, E2, E3 et plus récemment E4) (fig.3.4). Il existe 50 sérotypes différents mais la plupart des vecteurs actuels dérivent des sérotypes 2 et 5 (31-33).

Leur production peut atteindre des quantités élevées, mais elle sera d'autant moins efficace que la délétion du génome sera étendue. La production d'adénovirus très remaniés permet de tendre vers le vecteur « idéal ».

Leurs avantages reposent sur :

- une grande capacité de transport.
- la longueur des inserts.
- la grande variété des types cellulaires infectables, quelque soit leur état de prolifération.

Leurs qualités en font des candidats de choix pour la thérapie génique *in vivo*. En revanche, si un grand nombre de types cellulaires sont permissifs pour les adénovirus, leur sensibilité à l'infection est faible, rendant nécessaire le recours à des titres de solutions virales élevés. Or les fortes concentrations virales sont toxiques (par l'intermédiaire de leur capsule) pour les cellules exposées. L'expression, par les cellules hôtes, de peptides viraux les rend responsables de l'acquisition d'une immunité humorale qui limitera la réadministration du même type de vecteur (33).

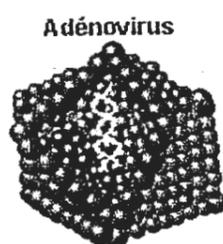


Figure 3.3 : structure d'un Adénovirus (6).

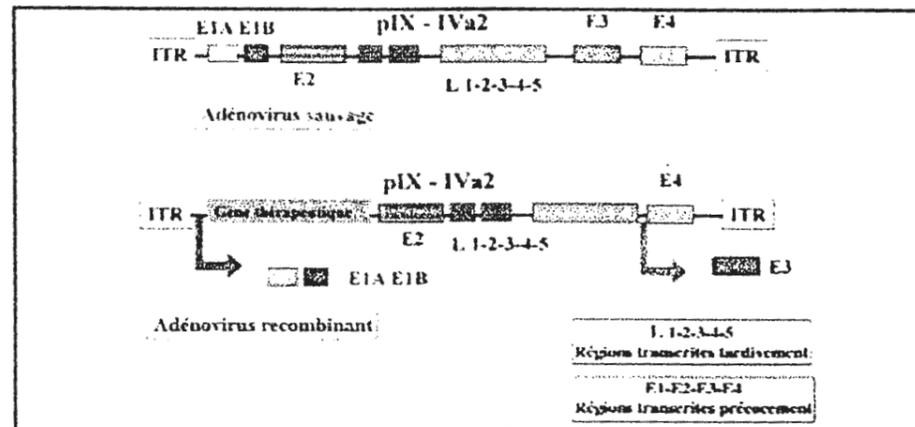


Figure 3.4 : construction d'un Adénovirus recombinant (6).

#### 4.1.3 Virus Adéno-associé (AAV) :

C'est un parvovirus de petite taille non enveloppé possédant une molécule d'ADN monocaténaire.

Ce virus est capable de se répliquer seul, sans la co-infection par un autre virus. En l'absence de virus, l'AAV s'intègre dans le génome de la cellule hôte au niveau d'une région spécifique du chromosome 19 chez l'homme. 8 sérotypes ont été identifiés à ce jour et aucun ne se montre pathogène (31-33).

#### 4.2 Les vecteurs non viraux :

Les vecteurs de transfert de gène totalement synthétiques présentent a priori plusieurs avantages:

- Leur synthèse peut être réalisée en grande quantité, plus facilement et à moindre coût que celle de vecteurs viraux.

- Les risques de propagation accidentelle du matériel génétique sont négligeables.

- Les séquences de grandes tailles peuvent être véhiculées.

En dépit d'une efficacité encore très faible, les vecteurs synthétiques occupent la seconde place dans l'ensemble des essais cliniques réalisés à ce jour (34).

Ces vecteurs sont utilisés dans 17% des protocoles cliniques, les plus utilisés sont :

**Lipoplexe :** Ils sont constitués à base d'ADN, de lipides, de protéines ou de polymères cationiques, ce sont donc des composés lipidiques associés à une molécule d'ADN plasmidique. L'avantage est qu'ils ne provoquent pas de réactions immunitaires.

**ADN plasmidique :** C'est une molécule d'ADN monocaténaire circulaire. On peut faire une injection directe de cet ADN.

Étant donné leur composition, ces vecteurs sont inertes donc inoffensifs pour l'homme (fig.3.5).

Néanmoins des inconvénients subsistent concernant notamment leur efficacité. En effet il faudrait environ 100 000 molécules d'ADN par cellule cible pour qu'une

seule séquence d'ADN parviennent à pénétrer dans le noyau. Mais à cette concentration un autre problème se pose c'est celui de la toxicité cellulaire. De plus, il faut que l'ADN soit libéré de son vecteur.

L'ADN étant une molécule polyanionique, donc chargée négativement, elle a du mal à traverser la paroi des cellules qui est formée de molécules lipidiques négatives. Dans la nature on assiste à une compaction de l'ADN par des molécules composées d'acides aminés chargés positivement comme les histones, qui sont donc chargées de condenser l'ADN.

Cette multiplicité de vecteurs montre qu'il n'existe pas pour le moment de vecteur universel.

L'adénovirus est le plus adapté pour des traitements *in vivo* requérant une expression à court terme. L'incorporation d'éléments permettant de cibler les cellules transduites, mais aussi la réduction de l'immunogénicité permettrait d'étendre le champ de ses applications.

Les vecteurs non viraux assurent une transfection efficace et durable *in vivo* mais, ne sont pas disponibles. Cette approche semble pourtant intéressante car elle est à l'origine d'un ciblage précis, d'une faible immunogénicité.

Injection d'ADN plasmidique

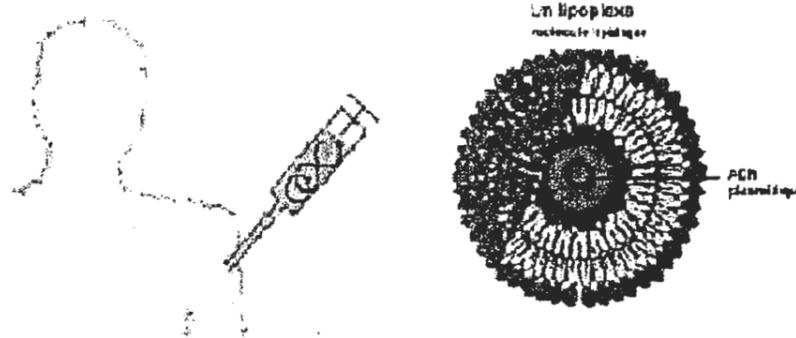


Figure 3.5 : les vecteurs non viraux les plus utilisés (6).

## 5. LES DIFFÉRENTES MÉTHODES DE LA THÉRAPIE GÉNIQUE :

Plusieurs méthodes peuvent être envisagées, en fonction de la pathologie concernée et des cellules qui doivent être ciblées par le gène médicament, on peut distinguer trois méthodes (fig. 3.6) :

### 5.1. La thérapie génique *ex vivo* :

Elle consiste à prélever sur le patient les cellules cibles, à les modifier génétiquement avec le vecteur viral porteur du gène thérapeutique, puis à les réintroduire chez le patient. Cette méthode est utilisée en particulier pour les cellules sanguines qui sont faciles à prélever et à réintroduire (7-31).

### 5.2 La thérapie génique in situ :

Elle consiste à placer directement au sein du tissu cible le vecteur de transfert. Cette technique est expérimentée, notamment, dans les cas de mucoviscidose (transfert de vecteur dans la trachée et les branches), de cancer (injection dans la tumeur d'un vecteur portant le gène d'une toxine, par exemple) (7).

### 5.3 La thérapie génique in vivo :

Elle consiste à injecter le vecteur portant le gène thérapeutique directement dans la circulation sanguine ; le vecteur est alors censé atteindre spécifiquement les cellules cibles (7-31).

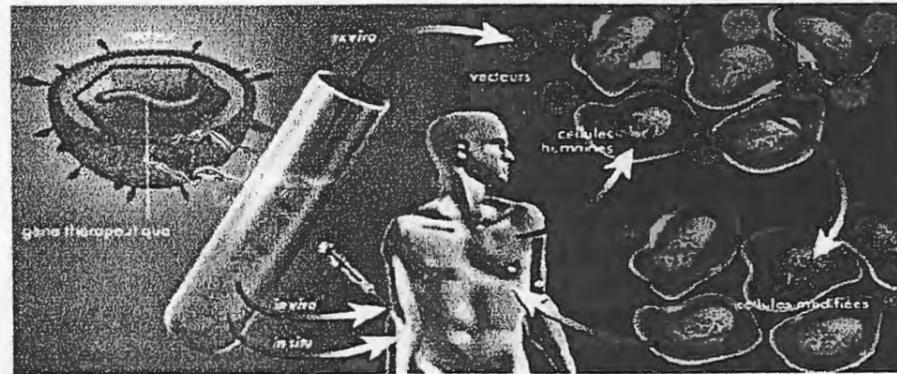


Figure 3.6 : les méthodes envisagées en thérapie génique (6).

## 6. LES ÉTAPES DE LA THÉRAPIE GÉNIQUE :

- Prélever des cellules du patient.
- Supprimer une partie du génome d'un rétrovirus.
- Insérer un gène humain thérapeutique dans le génome viral.
- Réinjecter le rétrovirus modifié dans les cellules somatiques prélevées.
- Réinjecter les cellules au patient (fig.3.7).

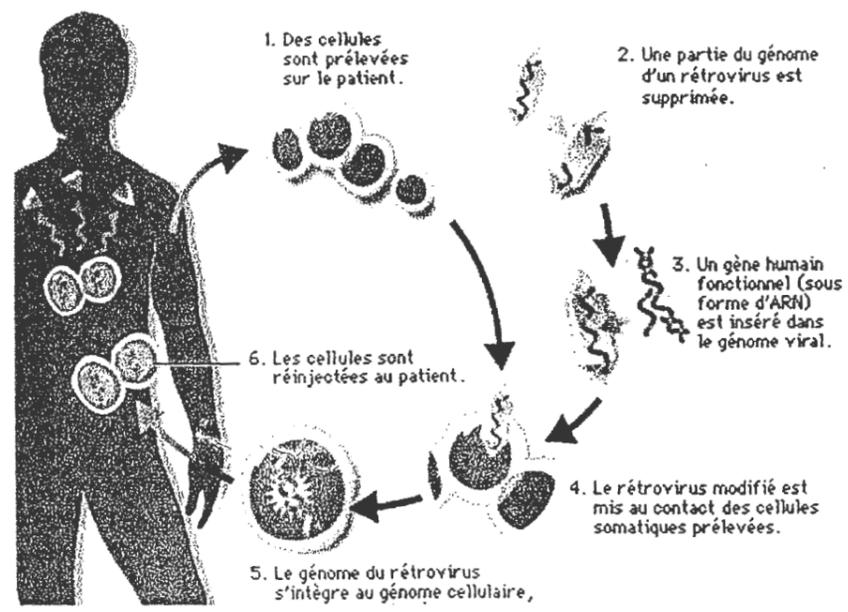


Figure 3.7 : Les différentes étapes de la thérapie génique (6).

# Chapitre IV

Protocoles de la  
thérapie génique Anti-HIV

## 1. POURQUOI S'ORIENTER VERS LA THÉRAPIE GÉNIQUE ?

Depuis son introduction en 1981, le Sida est traité à l'aide des médicaments antiretroviraux (AZT, ddc...etc). Et malgré le grand nombre de comprimés de ces médicaments avalés par le patient, le virus persiste dans les réservoirs ou ces médicaments ne peuvent pas l'atteindre. Cette persistance constitue un phénomène particulièrement problématique et qui donne à penser qu'il faudrait envisager un traitement à vie.

En outre l'apparition des effets secondaires de ces médicaments, et l'apparition aussi des souches de HIV résistantes entraînent des problèmes qui ne cessent pas de croître.

On comprend ainsi pourquoi les recherches de la lutte contre le SIDA s'orientent vers une nouvelle génération thérapeutique représentée : par la thérapie génique. D'ailleurs, elle représente à l'heure actuelle l'unique alternative.

### Remarque:

Le HIV-1 est le plus fréquent et le plus virulent. C'est pour cette raison que c'est le HIV-1 qui est la cible des thérapies géniques.

## 2. LES STRATEGIES DE LA THERAPIE GENIQUE ANTI-HIV

### 2.1 PREMIERE STRATEGIE : RENDRE LES LYMPHOCYTES T RESISTANTS

#### 2.1.1 Première approche: surexpression des interférons

Il est bien connu que l'IFN constitue l'un des plus puissants systèmes de défenses développés par la cellule contre les infections virales. Dans le cas du sida, le HIV contourne les défenses immunitaires de l'hôte par destruction des lymphocytes CD4+ et aussi par répression de la synthèse des IFN.

L'activité anti-HIV des gènes des IFN $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  a été testée dans le modèle de la souris SCID-Hu inoculée avec le virus in vivo. L'infection par le HIV-1 chez la souris SCID-Hu est associée à une forte induction de la production des IFN $\alpha$  et  $\beta$  inhibant la réplication et la charge virale, alors que l'IFN $\gamma$  n'inhibe presque pas l'infection, bien qu'il soit efficacement exprimé. Ici, la synthèse des IFN est inductible par le HIV. Elle est sous le contrôle du gène TAT du HIV-1. En conséquence, la synthèse de l'IFN s'arrête dès que l'infection par le HIV disparaît (3).

**2.1.1.1 Interféron  $\alpha$  :** est une substance sécrétée par les cellules lorsqu'elles sont infectées par le virus HIV (20), elle est produite par génie génétique et capable d'inhiber la synthèse des protéines virales et leur assemblage (19). Cette substance inhibe plus ou moins efficacement la réplication virale au sein des cellules adjacentes dans les quelles elle diffuse (20).

**2.1.1.2 Interféron  $\beta$  :** L'interféron- $\beta$  est une protéine antivirale à large spectre, susceptible d'inhiber la réplication du VIH à différents stades de son cycle infectieux.

Bien que le gène de l'interféron  $\beta$  soit normalement présent dans l'organisme, il manque d'efficacité lors de l'infection par le HIV car les gènes de l'interféron ne s'expriment pas assez. Cela est dû au fait que le HIV contourne en grande partie le mécanisme de défense antivirale naturel, qui consiste à stimuler la synthèse des interférons lorsqu'il y a infection.

Dans un premier temps, l'équipe d'Edward De Maeyer du Laboratoire de génétique des cytokines et de la différenciation (UMR 146 CNRS-Institut Curie, Orsay) a mis au point une construction génétique contenant un gène d'interféron- $\beta$ . Ce vecteur est ensuite introduit dans des globules blancs du sang isolé, où le gène de l'interféron- $\beta$  s'exprime spontanément.

Les chercheurs ont commencé par démontrer, que lorsque le gène est introduit dans les lymphocytes de donneurs sains, les cellules deviennent résistantes à l'infection par le HIV.

Dans une deuxième étape, ces chercheurs ont démontré, que l'introduction du gène dans les lymphocytes provenant de malades du sida inhibe, in vitro, la propagation du virus porté par les malades.

Il restait à savoir si le gène de l'interféron- $\beta$ , bien que protégeant contre l'infection par le HIV dans les essais in vitro, n'avait pas d'effets nocifs sur les fonctions importantes exercées par ces cellules dans la défense contre les maladies infectieuses en général. Il a été observé, toujours in vitro, que la production continue de faibles quantités d'interféron- $\beta$  restaure les fonctions immunitaires diminuées et altérées des lymphocytes provenant de malades séropositifs.

En vue de tels essais, la méthode sera d'abord testée sur des singes *Cynomolgus* infectés par le virus de l'immunodéficience simienne (VIS), qui est l'homologue du HIV chez l'homme.

Enfin, pour obtenir une résistance à très long terme, il sera nécessaire d'introduire le gène de l'interféron- $\beta$  non dans les lymphocytes, mais directement dans les cellules souches primitives de la moelle osseuse, dont dérive l'ensemble des cellules du système immunitaire. (36)

**2.1.1.3 Interféron  $\gamma$  :** l'infection par le HIV-1 chez la souris SCID-Hu est associée à une forte induction de la production des interférons  $\alpha$  et  $\beta$  inhibant la réplication et la charge virale, alors que l'interféron  $\gamma$  n'inhibe presque pas l'infection, bien qu'il soit efficacement exprimé (3).

### **2.1.2 Deuxième approche : introduction d'un gène codant pour une protéine anti-HIV**

En 1996, une équipe de recherche de l'Howard Hughes Médical Institute (Ann Arbor, Michigan) a étudié des façons d'aider les cellules TCD4 à résister à l'infection par le HIV. Sa Stratégie est d'infecter les cellules TCD4 avec les gènes nécessaires pour fabriquer une Protéine anti-HIV appelée Rev M10. Leurs expériences, faites en laboratoire, ont montré que cette protéine peut :

- empêcher HIV de transformer les cellules en usine à virus.
- Permettre aux cellules TCD4 de remplir leur fonction.

On ne peut pas vraiment dire que la thérapie utilisée constitue un réel succès: en effet, le taux de réussite de l'infection des cellules par le gène anti-HIV fut seulement de 10%.

Cela entraîne de trop nombreuses perfusions, qui durent trop longtemps, où les cellules protégées sont injectées en trop petit nombre (2).

## 2.2 DEUXIÈME STRATÉGIE : BLOQUER LE VIRUS DU HIV

### 2.2.1 Première approche : inhibition des fonctions régulatrices des protéines virales TAT et REV

Les protéines TAT et REV produites très précocement durant le cycle viral sont essentielles à la réplication de HIV-1. TAT permet l'élongation de la transcription des gènes viraux et REV favorise le transport des ARN codant pour les protéines structurales vers le cytoplasme (37). Ces protéines TAT et REV sont des protéines nucléaires organisées en domaines biologiques distincts, dont notamment un domaine de localisation nucléaire et de fixation aux séquences virales cibles, un domaine de dimérisation (TAT), ou de multimérisation (REV) et un domaine de transactivation impliquée dans l'interaction de ces protéines avec des protéines cellulaires essentielles à la fonction de TAT et REV (37). Cette caractérisation fonctionnelle fine de ces deux protéines est l'aboutissement de nombreuses études systématiques des propriétés biologiques de variants biologiques engendrés, soit par mutagenèse dirigée, soit par production de peptides correspondant à des fractions successives de protéines TAT et REV (38-39).

Ces études ont permis de démontrer que certaines mutations affectant les domaines d'activation pouvaient engendrer des mutants ayant perdu toute activité régulatrice mais capable de bloquer en *trans* l'action des protéines virales natives. Les travaux de K.Sanhadji et son équipe ont confirmé ces observations et mis en évidence une localisation bien définie des acides aminés dont la mutation permet la production d'inhibiteurs transdominants. L'activité antivirale des mutants inhibiteurs transdominants a été démontrée in vitro par une analyse de la sensibilité au HIV-1 de lignées lymphocytaires exprimant de manière permanente les variants TAT et REV (4).

### 2.2.2 Deuxième approche: clivage des ARN viraux (immunisation intracellulaire)

Plusieurs autres stratégies de la thérapie génique du sida sont l'objet d'une intense investigation par nombreuses équipes. Parmi ces stratégies, certaines présentent des avantages particuliers. Ainsi, les transferts de gènes codants, soit pour des ribozymes anti- HIV-1, soit pour des leurres TAR (TAT receptor) et RRE (élément responsif REV) sont capables de conférer une résistance cellulaire significative à l'infection virale (4).

Ces molécules d'ARN dont les modes d'action respectifs consistent à cliver spécifiquement les ARN viraux, la dégradation de ces derniers a l'avantage d'interférer tant avec les étapes précoces du cycle viral qu'avec ses étapes tardives (40).

**2.2.2.1 Les ribozymes :** ce sont des molécules d'ARN à activité catalytique capable de détruire et cliver un ARN cible au niveau d'un ARN non codant tel que la région 5' du transcrit viral (41), soit au niveau d'un ARN codant pour le gène GAG ou ENV (42).

Dernièrement, l'équipe de Macpherson a travaillé sur le ribozyme anti-tat nommé Rz2. Elle a réalisé à cet effet un essai clinique de phase 1, via le transfert du gène Rz2 par un vecteur rétroviral. Au bout de 4 ans, la construction génique est toujours présente, prouvant ainsi la longue durée de vie du construit. Le gène est exprimé normalement et durablement.

De plus, la procédure de transfert de gène utilisée a démontré son haut degré de sécurité.

Les résultats ont donc prouvé la sécurité et la faisabilité de ce type d'approche (2).

**2.2.2.2 Les ARN antisens :** cette approche consiste à introduire un gène codant pour l'ARN antisens (séquence oligonucléotidique). Ce gène introduit dans les cellules est un gène viral qui fabrique un ARN messager antisens de l'ARNm du virus. L'avantage de cet ARNm antisens est qu'il va se combiner en s'hybridant, avec l'ARNm du virus et bloquer son fonctionnement en empêchant de donner naissance aux protéines virales (41).

Les ARN antisens les plus étudiés sont dirigés contre les gènes TAT, REV et ENV du HIV, pour une répression virale efficace, leur niveau d'expression doit être plus élevée.

Le premier essai mondial d'une molécule antisens, dans la lutte contre le sida, vient de débiter en France. C'est une molécule mise au point par la firme américaine Hybridon. Il s'agit du GEM 91 qui est un oligonucléotide de synthèse de 25 bases, complémentaires d'une partie de la séquence gag du HIV-1. Ainsi, on va tenter de bloquer le virus en s'attaquant à toutes les étapes de son cycle, et en particulier à la synthèse de la protéine gag (5).

**2.2.2.3 Les ARN leurres :** ils miment l'ARN viral et peuvent ainsi inhiber les fonctions virales essentielles en entrant en compétition avec l'ARN viral pour la fixation des facteurs viraux et cellulaires. Cette approche a été utilisée avec succès en utilisant des leurres correspondants aux séquences TAR (leurre de TAT) et RRE (leurre de REV) (43).

### **2.2.3 Troisième approche : neutralisation du virus par molécules solubles (les anticorps neutralisants 2F5)**

Plusieurs expériences avec des molécules simiennes ont démontrés la possibilité de protéger ces animaux contre une infection par HIV-1 et HIV-2 ou SIV par immunothérapie passive (injection des anticorps neutralisants préparés in vitro chez des malades dépourvus de ces anticorps) (44).

Cependant, l'application à l'homme de ce type d'approche est limitée par la nécessité de produire l'anticorps neutralisant ou l'immunotoxine à une échelle industrielle, et par le fait qu'un tel traitement nécessitera probablement des injections multiples.

Une molécule particulièrement intéressante est l'anticorps monoclonal 2F5 isolé par l'équipe de H.Kattinger (institut d'immunologie appliquée-Vienne, Autriche) (2). Cet anticorps d'origine humaine reconnaît un épitope très conservé de l'enveloppe virale et possède un pouvoir neutralisant vis-à-vis du virus. Il est spécifique d'une région assez conservée de gp41 du HIV-1 (3).

Un gros travail a été aussi conduit en Europe comme aux Etats-Unis sur ces anticorps prélevés chez des sujets séropositifs peu avancés dans l'infection par HIV, ont administré à des sujets très avancés dans l'infection (et donc dépourvus d'anticorps neutralisants) avec des résultats intéressants.

De même, on tente de stimuler la production d'anticorps neutralisants chez des séropositifs qui en sont dépourvus grâce à l'injection de différents types de préparations contenant du virus inactivé. Ce type de traitement est appelé immunothérapie active (on administre aux malades des protéines afin qu'il produise des anticorps). Par ailleurs, on a aussi injecté à des patients des LT cytotoxique cultivés in vitro, provenant des mêmes malades, capables de détruire les cellules infectées. Malheureusement les essais cliniques concernant cette forme d'immunisation cellulaire n'ont pas été concluants (19).

### 2.3 TROISIÈME STRATÉGIE : PIÉGER LE VIRUS

**Molécules sCD4 solubles :** il s'agit d'une protéine leurre du virus car la molécule TCD4 est le récepteur naturel du HIV (gp120) à la surface des cellules hématopoïétique (3). L'injection du gène codant cette molécule (sCD4) produit des protéines inhibant les récepteurs CD4, une fois l'injection est réalisée, la protéine est produite en continu in vivo. Outre le fait qu'ils empêchent le virus de se reproduire, ces récepteurs ont également la particularité d'être nomades.

Les observations montrent que les virus se précipitent sur les CD4 nomades, s'y fixent et finissent par mourir incapables de prendre le contrôle de la cellule. Leur nombre chute en trois semaines. En effet, la charge et la propagation du virus se réduisent significativement (2).

Les performances de cette molécule thérapeutique ont été améliorées en lui associant d'autres fragments de protéines, telle que la chaîne lourde des immunoglobulines G. Ainsi, l'immunoadhésine sCD4-IgG a l'avantage d'être dégradée plus lentement dans l'organisme que sCD4 (3).

## 3. AUTRES STRATÉGIES

### 3.1 Le gène suicide

Dans ce volet, la voie toxigénétique mérite d'être signalée. Elle est basée sur l'introduction, dans les lymphocytes CD4+ et les macrophages, d'un gène qui fabrique une toxine végétale, bactérienne ou virale. La fabrication, induite par le HIV lui-même, d'une très faible quantité de cette toxine suffit à tuer la cellule. Le gène suicide toxique le plus couramment utilisé est le gène de l'enzyme thymidine kinase de l'herpès simplex (HSV). Sous le contrôle des protéines du HIV et en présence de ganciclovir ou d'aciclovir (médicaments antirétroviraux), l'accumulation des produits phosphorylés

par la kinase se traduit par une toxicité cellulaire telle que rapportée par les travaux de D.Klatzman (3) (fig.4.1).

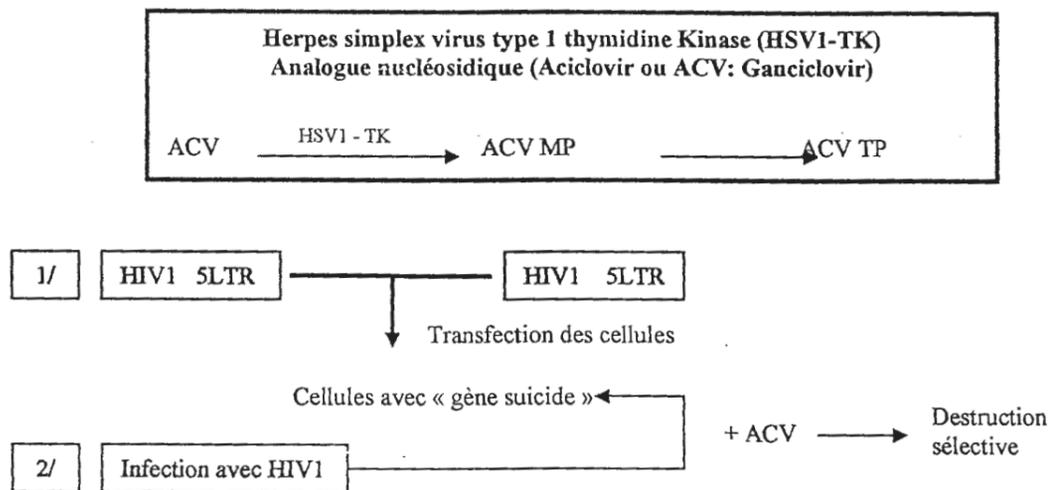


Figure 4.1: le mode d'action du gène suicide (5).

### 3.2 Les cellules suicides

Cette approche consiste à modifier les cellules hématopoïétiques de manière à ce que l'infection par le HIV induise la synthèse de produit toxique entraînant la mort de la cellule avant toute production de nouvelles particules virales. Le concept est séduisant et a démontré son efficacité *in vitro* et dans le modèle de la souris SCID-Hu *in vivo*. Son application ne peut être envisagée, actuellement, chez l'homme en raison de la nécessité d'infecter un très large pourcentage de la population cellulaire cible pour espérer la protéger (3).

### 3.3 Les anticorps intracellulaires

Une stratégie plus récente consistant à synthétiser de manière intracellulaire un anticorps simple-chaîne dirigé contre une protéine virale régulatrice ou structurale semble être une voie plus prometteuse, tant en raison de son apparente efficacité antivirale, que de la possibilité d'humaniser ces anticorps afin de réduire leur immunogénicité potentielle. Il reste néanmoins difficile de comparer l'efficacité et les avantages respectifs de cette stratégie par rapport aux autres, chaque laboratoire utilisant des réactifs (isolats viraux, cellules...) non standardisés. De plus, aucune donnée *in vivo* n'est actuellement disponible pour la majorité de ces approches. C'est pourquoi K.Sanhadji a choisi de développer et d'évaluer, en parallèle, dans un même laboratoire, plusieurs stratégies de thérapie génique, l'évaluation dont il ressort que le transfert de gènes IFN inductibles par TAT est probablement aujourd'hui la voie la plus prometteuse (45).

#### 4. UNE TOUTE NOUVELLE DECOUVERTE

In vitro, les cellules de singe sont plus difficiles à infecter avec le VIH que les cellules humaines.

Des chercheurs viennent d'en trouver la raison: elle est génétique et repose sur un gène: Trim 5  $\alpha$ , qui diffère légèrement entre le macaque rhesus et l'humain.

C'est le domaine SPRY du gène qui reconnaît le virus comme cible, et qui est responsable du blocage de la réplication du virus. Les domaines SPRY du singe et de l'Homme ne diffèrent que d'une substitution d'un seul acide aminé.

L'équipe a ainsi pu découvrir qu'une simple substitution d'acide aminé dans le gène Trim 5 humaine peut rendre les cellules humaines ainsi modifiées résistantes au virus. Trim 5 jouerait donc un rôle crucial dans la capacité d'un organisme à résister à l'infection ou au contraire à développer le SIDA.

On peut imaginer déjà la mise au point d'une thérapie génique permettant de rendre les individus résistants à l'attaque du HIV. Cela demanderait cependant plusieurs années de recherches, et, en l'état actuel des connaissances, coûterait très cher. (46).

**Remarque :** ces recherches étant actuellement à leur début, le nombre de publications est encore assez restreint.

#### 4. MODELES ANIMAUX ET STRATEGIES THERAPEUTIQUES

Le chimpanzé est à ce jour le seul animal sensible à l'infection par le HIV-1, mais son prix, son statut d'animal protégé et l'absence de développement de signes cliniques limitent son utilisation pour l'évaluation de protocoles de thérapie génique. C'est pourquoi, malgré des insuffisances évidentes, les souris immunodéficientes SCID humanisées par injection de lignées cellulaires humaines, de lymphocytes humains primaires (47) ou par réimplantation de tissus foetaux humains constituent un modèle animal à considérer avec attention dans le cadre d'une évaluation préclinique (**fig.4.2**).

K.Sanhadji et son équipe ont pu confirmer dans ce modèle la résistance *in vivo* des lignées cellulaires portant les gènes *IFN* inductibles par TAT ou exprimant simultanément les inhibiteurs transdominants de TAT et REV. Cependant, la souris Scid étant ici utilisée comme simple « tube à essai », ce modèle ne reproduit en aucun cas un environnement biologique semblable à celui des patients séropositifs.

En revanche, la reconstitution hématopoïétique de souris Scid par greffe de fragments thymiques foetaux humains et administration de cellules souches humaines génétiquement modifiées, d'après le modèle de Péault *et al.* (48), constituerait une amélioration notable du système.

Néanmoins, le meilleur modèle préclinique du SIDA reste probablement l'infection du macaque par le virus de l'immunodéfience simienne (SIV). Contrairement au HIV-1 chez le chimpanzé, SIVmac peut induire une maladie très proche du SIDA dans des délais compatibles avec l'étude expérimentale.

En outre, de nombreux clones moléculaires et biologiques correspondant à plusieurs isolats viraux sont disponibles, le macaque est d'un coût bien plus modéré que le chimpanzé, et l'espèce n'est pas en danger (49).

Par ailleurs, l'utilisation intensive de ce modèle animal pour de nombreuses études vaccinales permet aujourd'hui de disposer de nombreux réactifs biologiques. Nul doute que malgré la lourdeur de ce modèle, de nombreuses équipes impliquées dans le développement de stratégies de thérapie génique du SIDA seront

progressivement amenées à s'y intéresser. Ils ont pour leur part démontré, dans le cadre de la préparation d'un protocole clinique, que des lymphocytes CD4+ de macaque pouvaient être efficacement purifiés, cultivés, infectés par les vecteurs rétroviraux portant les gènes *IFN* humains décrits précédemment, et réadministrés de manière autologue aux animaux. Il ont ainsi pu observer la persistance *in vivo* des cellules infectées durant plus de six mois.

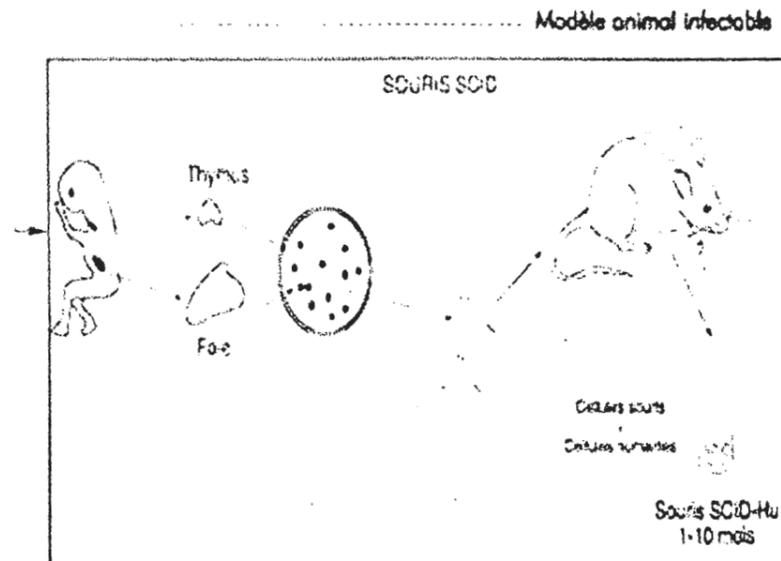


Figure 4.2 : modèle animal infectable (5).

# Discussion

Les rares équipes en position de proposer aujourd'hui un protocole clinique de thérapie génique du SIDA ont choisi de se focaliser dans un premier temps sur l'infection par un vecteur et la réadministration autologue des lymphocytes CD4+.

Le seul protocole aujourd'hui en cours est celui de G.Nabel aux Etats-Unis, dans lequel un gène codant pour un inhibiteur transdominant de REV a été transféré à des lymphocytes CD4+ isolés de patients infectés, d'autres protocoles américains ont été proposés et approuvés par les commissions de réglementation mais n'ont pas encore débuté.

De leur part, Kamel Sanhadji et son équipe préparent un essai clinique de phase I dans lequel ils procèdent à l'administration autologue de lymphocytes CD4+ génétiquement modifiés par transfert rétrovirale des gènes IFN $\alpha$  et  $\beta$  humains à expression inductible par TAT. bien que certains de ces protocoles aient obtenu in vitro des résultats encourageants, il reste de savoir que l'introduction du gène thérapeutique dans les lymphocytes CD4+ périphériques ne constitue pas une solution car leur durée de vie est courte. Et pour des raisons d'efficacité, il faut introduire les gènes d'intérêt dans les cellules souches hématopoïétiques, en particulier les cellules CD34+. Ceci, va donner naissance à des cellules dans le sang, les ganglions, la rate et le Thymus indéfiniment protégées. Donc, ces cellules souches hématopoïétiques constituent les cibles privilégiées pour une thérapie génique Anti-HIV.

Cependant, malgré des progrès récents indéniables la manipulation génétique de ces cellules souches reste encore mal maîtrisée.

Il reste à noter que les dangers potentiels de la thérapie génique sont à la mesure de ses avantages, c'est à dire considérable. L'introduction d'un gène modifié dans un être vivant pourrait constituer un risque majeur si jamais ces gènes venaient à acquérir de nouvelles fonctions par mutation, ou si la régulation de leur expression devenait défailante (provoquant respectivement un risque de pathogénicité ou une multiplication non contrôlée), ou en cas d'une erreur au cours de la manipulation.

En outre la thérapie génique soulève de nombreux problèmes éthiques.

C'est en effet une thérapeutique qui touche directement au patrimoine génétique de l'homme.

C'est pour cette raison, les scientifiques devront, dans les années à venir, réussir le double défi de résoudre les problèmes éthiques et de mettre en œuvre le potentiel médical et thérapeutique nécessaire.

# Conclusion

La thérapie génique est l'alternative la plus prometteuse et la plus porteuse d'espoir pour les sujets atteints du SIDA qui est jusqu'aujourd'hui une maladie mortelle, et une pandémie mondiale causée par le virus HIV qui est un rétrovirus possédant deux copies d'ARN liées à une transcriptase inverse, il est caractérisé par une très grande variabilité génétique qui le rend résistant aux différents médicaments antirétroviraux.

Dans notre modeste travail nous avons démontré que la thérapie génique est la plus efficace approche thérapeutique qui consiste à prélever des cellules somatiques du patient, les modifier génétiquement en introduisant un gène d'intérêt thérapeutique puis, les réinjecter au patient. La thérapie génique anti-HIV est cantonnée aux modèles animaux (souris SCID humanisées, ou chez les macaques réshus) et non pas sur l'homme car elle touche directement au patrimoine génétique de l'être humain et présente des dangers potentiels si les gènes d'intérêt thérapeutique venaient à acquérir des nouvelles fonctions par mutation, si la régulation de leur expression devenait défailante, ou en cas d'une erreur au cour de la manipulation.

En conclusion, ce travail nous a permis d'approfondir nos connaissances et de mieux comprendre ce sujet d'actualité : thérapie génique du SIDA.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] VERMA I. La thérapie génique. Pour la science 1991 ; 159 : 44-52.
- [2] J. M. DARIOSECQ, P. M. GIRARD. Infection VIH, mémento thérapeutique 1998, Doin éditeurs.
- [3] K.SANHADJI, J.L.TOURAINE. Thérapie génique expérimentale de l'infection par le HIV : espoirs et perspectives. La lettre de la FNCLS- N°15 septembre 2001 ; 2-3.
- [4] T. SORG, P. LEISSNER, V. CALENDIA, P. LEROY, K. SANHADJI, J. L. TOURAINE, A. PAVIRANI, M. MEHTALI, Thérapie génique de maladies infectieuses.M/S 1996 ; 12 : 13-24.
- [5] SAIDAL Santé. Le SIDA, l'infection à VIH : le point sur la recherche. Quatrième trimestre 99 ; N° 03 : 7-40.
- [6] C. BARD, C. BONET, V. LAUDY, E. NIGUET. La thérapie génique. Veille technologique et mini projet, université de Nice. 2005/2006 ; 24-61.
- [7] YVES MORIN. Petit Larousse de la médecine, édition ÉDITH YBERT juin 2001 ; 271-290.
- [8] MORANGE (MICHEL). De la découverte de l'ADN au drame du sang contaminé. Médecine/Science N° 08, JHON LIBBEY EUROTTEXT, 1995 ; Vol 11 ; 68-75.
- [9] ARCAT- SIDA. Association. Le SIDA, comprendre pour mieux lutter. Essentiels Milan 2001 ; 35-47.
- [10] BARRÉ- SINOUSI, F. CHERMANN, J. C. REY, F. NUGEYRE, M T., CHAMARET, S., GRUST, J. DAUGUET, C., AXLER-BLIN, C., VEZINET- BRUN, F., ROUZIOUX, C. et al. Isolation of a T-lymphatropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science 220,1983. 868-871.
- [11] GRENIK (MIRKO). Histoire du SIDA: début et origine d'une pandémie actuelle, Paris, Payot, 1992 ; 98-102.
- [12] GERARD J. TARTORA, BARDELL R. FUNK, CHRISTINE L. CASE. Introduction à la microbiologie. 7<sup>ème</sup> édition. G. TOR 2001 ; 560-575.
- [13] FERNARD BRICOUT, EMMANUEL GRIMPREL. Guide de virologie médicale. Faculté de médecine Saint- Antoine Paris 6, ellipse 1998 ; 99-101.
- [14] FRONÇOISE AUBERT, PHILLIPE GUITAREL. L'essentiel Médical. Berti édition.
- [15] ABDELJALIL BEZZAOUCHA. Maladie à déclaration obligatoire profil épidémiologique, maladie bénéficiant d'un programme de lutte. Office des publications universitaires. 1999 ; 65-72.
- [16] J. ETIENNE. Biochimie génétique biologie moléculaire 5<sup>ème</sup> édition Masson 1999 :235-260.
- [17] SMAIL BOULBINA. Diagnostic SIDA 1993, mensuel n°15, juin1993.
- [18] FREED. EO. MOULOU AJ. The cell biology of HIV-1 and other retroviruses. retrovirology 3 November 2006; 3:77-89 review PMID:1700 83 721.
- [19] AMMAR ACHOUR .virus et SIDA expliqués à tous .Offices des publications universitaires 2005 ; 5-54.
- [20] CAMEL AVENTURE. Going for discovery, dossier SIDA science et vie, N°179, juin 1992 ;17-85.
- [21] LAUSING M. PRESCOTT, JOHN P. HARLEY, DONALD A KLEIN. Microbiologie. 2<sup>ème</sup> édition française 2003, 878-880.
- [22] DELFRAISSY. J F. Mécanismes immunologiques et virologiques impliqués dans l'infection humaine : Impact des traitements. La revue du praticien 1999/, 49 ; 1740-1745.
- [23] HODD, NEUMANN AU, PERELSON AS, CHEU W, LEONARD JM, MARKOWITZ M. Rapid turnover of plasma virious and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. Nature Jan 12; 373 (6510): 123-126.
- [24] COHEN, J. (1994). The controversy over HIV and AIDS. Science 266 (5191): 1642-1649.
- [25] ENGVALL E, PERLMAN P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunogloboline G, immunochemisty, 1971 September; 8(9): 871-874 PMID 5135623.
- [26] F. BRUN- VEZINET et J. DORMONT. Mesure de la charge virale dans le suivi des patients atteints par le HIV, méthodes et indications. Flammarion. Médecine- Science, Paris, 1996 ; 35-47.

- [27] **CLAVEL (François)**. Les traitements anti-viraux permettent-ils d'espérer une éradication de l'infection par le VIH ? *Médecine- Science*, N° 10, Masson, 1997 ; Volume 13 : 1227-1229.
- [28] **LECOZ**. Deux approches complémentaires dans la lutte anti HIV, immunothérapie : combien les antiretroviraux et la stimulation immunitaire info traitements, N° 72 septembre 1999 ; 4-5.
- [29] **JEAN- FRANÇOIS BACH, LUCIENNE CHATENAUD**. Immunologie de la biologie à la clinique. *Médecine- Science*. Flammarion. 4<sup>ème</sup> édition 2002 ; 44-57.
- [30] **PRIMOSE, TWYMAN, OLD**. Principe de génie génétique de Boeck, octobre 2004 : 290-295.
- [31] **RENÉ SCRIBAN** Coordonnateur. *Biotechnologie*. 5<sup>ème</sup> édition : TEC & DOC 1998 : 795-814.
- [32] **MISUARIA S, KAMINIRA M, NISHIJIMA K, LIJIMA S, J BIOSCI BIOENG**. Intégras- mediated non viral gene transfection with enhanced integration efficiency. 1999; 88 (5): 461-467.
- [33] **JOSUÉ FEINGOLD, MARC FELLONS, MICHEL SOLIGNAC HERMANN**. Principe de génétique humaine. Edition des sciences et des arts, 1998 : 586-590.
- [34] **COTTEN M, WAGNER E et BIRNSTIEL ML (1993)**. Receptor mediated transport of DNA into eukaryotic cells. *Methods in Enzymology* 217, 618-645.
- [35] **NALDINI L, ET al**. In vivo gene delivery and stable transduction of non dividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996; 272: 263-267.
- [36] **SANGRO, B, M. HERRAIZ and J. PRIETO**. Gene therapy of neoplastic liver diseases, 2003. 35 (2): 135-148.
- [37] **STEFFY K, WONG-STAAAL F**. Genetic regulation of HIV. *Microbiology Revue* 1991; 55: 1193-205.
- [38] **MALIN MH, BOHNLEIN S, HAUBER J, CULEN BR**. Functional dissection of the HIV-1 REV transactivator- derivation of a transdominant repressor of REV function. *Cell* 1989; 58: 205-214.
- [39] **MODESTI N. GARCIA J, DEBONK C, PETERLIN M, GAYNAR R**. Transdominant TAT mutants with alterations in the basic domain inhibit gene expression. *New boil* 1991; 3: 759-768.
- [40] **CAPUTO A et al**. Studies on the effect of the combined expression of anti TAT and anti-REV gene on HIV-1. *Replication gene ther* 1997; 4: 288-295.
- [41] **YU. M. et al. A. HAIRPIN**. Ribozyme inhibits expressions of diverse strains of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 6340-6344.
- [42] **DROPULIC B, LIN NH, MURTI MA, JEANG KT**. Functional characterization of a U5 ribozyme: intracellular suppression of human immunodeficiency virus type 1 expression. *J. viral* 1992; 66: 1432-1441.
- [43] **LISZIEWICS J et al**. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by regulated expression of a polymeric TAT activation response ARN decoy as a strategy for gene therapy in AIDS. *Proc Natl Acad. Sci USA* 1993; 90: 8000-8004.
- [44] **PUTKONEN P, THARSTENSSON R, GHAVAMZADEH L, ALBERT J, HILD. K, BIBERFELD G, NORRBY E**. Prevention of HIV-2 and SFVsm infection by passive immunization in cynomolgus monkeys. *Nature* 1992; 352: 436-438.
- [45] **CHEN SY, KHOURI Y, BAGLEY J, MARASCO WA**. Combined intra- and extracellular immunization against HIV-1 infection with a human anti-gp120 antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91 : 5932-6.
- [46] **YAP MW, NICOLE S, STOYE J P**. A single amino acid change in the SPRY domain of human trim 5 alpha leads to HIV-1 restriction, January 2005. PMID: 15649369.
- [47] **SCHLIENGER K, MANCINI M, TIOLLAIS P, MICHEL M**. Vaccination contre le SIDA : évaluation chez les primates. *Médecine / sciences*. 1995; 11: 985-93.
- [48] **Mosier DE, Gulizia RJ, Baird SM, Wilson DB, Spector DH, Spector SA**. HIV-1 infection of human PBL-SCID mice. *Science* 1991; 251: 791-4.
- [49] **McCune J, Kaneshima H, Krowka J, Namikawa R, Outzen H, Peault B, Rabin L, Shih CC, Yee E**. The SCID-hu mouse: a small animal model for HIV infection and pathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 399-429.

Date de soutenance :

Le 19/06/2007

Nom et Prénom :

Kemmache Widad

Dahmani Farida

Sayoud Abdel Ali

**THEME**

**Thérapie génique Anti-HIV**

**Nature de diplôme : D.E.S**

**Option : Microbiologie**

**Résumé:**

La maladie du SIDA est caractérisée par la disparition des réactions immunitaires causée par le virus HIV, les progrès de la recherche ont abouti à des traitements actifs associant plusieurs médicaments antiviraux (AZT, DDC, DDI...). Ces derniers permettent de freiner l'évolution du SIDA. Cependant aucun moyen n'existe encore pour la guérir. Ceci fait orienter les chercheurs vers des nouvelles perspectives thérapeutiques tels que : l'immunothérapie, thérapie génique, vaccinothérapie... Enfin, les recherches menées dans le domaines de la thérapie génique se font selon plusieurs orientations: Rendre les lymphocytes T résistants, bloquer le virus, piéger le virus et d'autres stratégies sont également l'objet d'une intense investigation.

**Mots clés :** Virus VIH, SIDA, trithérapie, thérapie génique, vaccinothérapie, chimiothérapie, immunothérapie.

**Abstract :**

AIDS is a disease wich characterized by the disappearance of the immune reactions caused by virus HIV, progress of research led to associating active treatments several antiviral drugs (AZT, DDC, DDI...). The latter makes it possible to slow down the evolution of the AIDS. However no means exists yet to cure it. This made direct the researchers towards new therapeutic prospects such as : the immunotherapy, genic therapy, vaccinotherapy... Lastly, the research undertaken in the fields of the genic therapy is done according to several orientations: To make the lymphocytesT resistant, to block the virus, to trap the virus and other strategies are also the object of an intense investigation.

**Keys words :** HIV virus, AIDS, tritherapy, genic therapy, vaccinotherapy, chemotherapy, immunotherapy.

**ملخص:**

يتميز مرض السيدا بضمور الجهاز المناعي المتسبب به فيروس نقص المناعة البشرية HIV، تطور الأبحاث توصل إلى علاج نشيط باستعمال عدة أدوية ضد فيروسية ، هذه الأخيرة تمكن من توقيف تطور مرض السيدا . في حين أنه لا يوجد حتى الآن أي دواء فعال لعلاجه، مما أدى بالباحثين للتوجه إلى طرق علاجية جديدة مثل : العلاج المناعي ، العلاج الوراثي، التلقيح . أخيراً، الأبحاث المتوصل إليها في ميدان العلاج الوراثي تقام حسب عدة اتجاهات : جعل الخلايا للمقاومة T مقاومة ، تثبيط الفيروس ، مغالطة الفيروس ، و استراتيجيات أخرى هي أيضا هدف استثمارات كبيرة .

**الكلمات المفتاح :** فيروس نقص المناعة البشرية VIH: السيدا ، العلاج الثلاثي ، العلاج الوراثي ، التلقيح ، العلاج الكيميائي والعلاج المناعي .