

ACADEMIE DE MONTPELLIER
UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

présentée à l'Université de Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc
pour obtenir le
DIPLOME DE DOCTORAT

SPECIALITE : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
Formation Doctorale : Parasitologie
Ecole Doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques
 pour la Santé

**RELATIONS ENTRE LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE
HUMAINE ET LES MALADIES SEXUELLEMENT TRANSMISSIBLES :**
Apport d'outils de diagnostic et de quantification virale
basés sur la biologie moléculaire pour l'étude de la contagiosité sexuelle.

par
Pierre KENGNE

Soutenue le 13 Décembre 1995

devant le Jury composé de:

MM. BOUIX Georges, Professeur, Université Montpellier II	Président
BRASSEUR Philippe, Professeur, CHU, Rouen	Rapporteur
DEI-CAS Eduardo, Maître de conférence, U42 INSERM, Lille	Rapporteur
VEAS Francisco, Chargé de Recherche, ORSTOM, Montpellier	Examineur
FREZIL Jean-Louis, Directeur de Recherche, ORSTOM, Montpellier	Directeur de Thèse

**A mon feu père
et à ma mère,**

A Félicité, Dany et Michaël

et à toi Nicole pour tout et surtout pour ce manuscrit

Ce travail a été réalisé au Laboratoire **Rétrovirus**, Institut français de recherche scientifique pour le développement en coopération (ORSTOM), Centre de Montpellier.

J'exprime tout particulièrement ma gratitude à Jean-Loup et Francisco sans oublier Cécile pour m'avoir accueilli dans ce laboratoire et spécialement à toi **Francisco** pour m'avoir suivi scientifiquement ici, me donnant ainsi la possibilité de m'initier à la recherche.

Je suis très honoré par la présence du **Professeur P. BRASSEUR** dans mon jury.
Ma gratitude va aussi aux membres de son équipe qui m'ont aidé dans ce travail.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance et mon profond respect à Messieurs **Le Professeur G. BOUIX**, et le **Docteur E. DEI-CAS** pour avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

A vous **M. J.L. FREZIL**, je vous suis particulièrement reconnaissant pour votre disponibilité et vos conseils.

Je remercie **E. DELAPORTE** qui aurait pu être membre de jury sans son emploi de temps surchargé, pour sa participation à l'aboutissement de ce travail.

Je tiens à remercier particulièrement C. BELLEC et Gérard CUNY pour leur soutien et leurs précieux conseils.

Au Docteur Rudi ROSSAU et à Marina (Innogenetics), je voudrais leur exprimer toute ma reconnaissance pour m'avoir permis de réaliser certains aspects délicats de ce travail.

Mes remerciements vont à tout le personnel du centre ORSTOM de Montpellier en particulier à mes amis Franz, Bruno, Sophie, Martine, Claire, Dorothée, Philippe, Frédérique, Delphine, Florian, Frédéric, Mariama, Samira, Issa, Valérie, Alexie, Sylvain, Lorena, Anne-Laure, Christian, Kathleen, Nâardifa, Florence, Euloge, avec une mention spéciale à mon complice Jean-Bosco.

Je tiens à remercier Sylvie MANGUIN et Sylvie HART pour leur aide précieuse et efficace à la réalisation de ce manuscrit.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
ETAT DES CONNAISSANCES.....	5
<i>I. Quelques rappels sur le SIDA</i>	6
A. Prévalence et distribution géographique	6
B. Le virus VIH	6
1. Découverte des virus VIH-1 et -2.....	6
2. Structure du génome du VIH-1	8
3. Tropisme du virus du SIDA	9
4. Cycle biologique du virus VIH	9
C. Rappels sur la physiopathologie du SIDA	12
D. Transmission sexuelle du virus VIH	12
<i>II. Les principales MST</i>	15
A. Incidence et distribution géographique des MST	15
B. Pathologie des MST	18
1. Pathologie des principales MST ulcératives	18
2. Pathologie des MST inflammatoires	18
3. Complications des MST de type inflammatoires	19
4. Quelques exemples de résistance des MST aux antibiotiques	19
<i>III. Interaction de l'infection VIH et des MST</i>	20
A. Impact des MST sur la transmission du VIH	22
1. MST ulcératives	22
2. MST non-ulcératives	22
B. Autres facteurs influençant la transmission du VIH	23
C. L'impact de l'infection VIH sur les MST	23
1. L'impact de l'infection VIH sur les MST non-ulcératives	24
2. L'impact de l'infection VIH sur les MST ulcératives.	24
<i>IV. L'Immunité des muqueuses et le VIH</i>	25
A. La réponse anticorps de la muqueuse	25
B. La réponse cellulaire cytotoxique (CTL) des muqueuses.....	26
<i>V. Les outils de diagnostic des MST (et du VIH)</i>	27

A. Diagnostic de <i>C. trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>T. vaginalis</i>	28
1. Diagnostic de laboratoire des infections à <i>N. gonorrhoeae</i>	28
2. Diagnostic de laboratoire des infections à <i>C. trachomatis</i>	28
3. Diagnostic de laboratoire des infections à <i>T. vaginalis</i>	29
4. Les nouvelles méthodes génétiques	29
B. Diagnostic du VIH et quantification virale	30
1. Diagnostic de laboratoire du VIH	30
2. Méthodes de quantification virale	31
OBJECTIFS	33
RÉSULTATS : CHAPITRE I.....	35
Mise au point des méthodes génomiques pour le diagnostic des MST inflammatoires.....	36
<i>I. Mise au point du diagnostic PCR direct de <i>Trichomonas vaginalis</i> sur prélèvements cervico-vaginaux (Publication n°1)</i>	<i>36</i>
<i>I.1. Culture et Préparation des ADNs</i>	<i>37</i>
A. Introduction	37
B. Matériel et Méthodes	37
1. Souches et origine des prélèvements	37
2. Culture des parasites et cinétique de croissance	37
3. Préparation de l'ADN de départ.....	38
C. Résultats	39
D. Discussion et conclusion	41
<i>I.2. Sélection de l'ADN cible et préparation des amorces pour la PCR</i>	<i>42</i>
A. Introduction	42
B. Matériel et méthodes.....	43
1. Souches et origine des prélèvements	43
2. Recherche de séquences répétées dans l'ADN de <i>Trichomonas vaginalis</i>	43
3. Clonage et séquençage d'un fragment répété	43
4. Choix des amorces pour la PCR	44
C. Résultats de la PCR	44
1. Détection de <i>Trichomonas vaginalis</i>	44

2. Identification d'un microsatellite	44
Conclusion Chapitre I (I): Mise au point du diagnostic direct par PCR de <i>T.vaginalis</i>	59
<i>II: Mise au point et évaluation d'une technique de détection simultanée ("Line Probe Assay," (LiPA)) de Chlamydia trachomatis et de Neisseria gonorrhoeae (Publication n° 2).....</i>	60
A. Introduction	60
B. Matériel et Méthodes	61
1. Souches et origine des prélèvements	61
2. Principe de la méthode "Line Probe Assay" (LiPA)	61
C. Résultats du LiPA	63
D. Discussion et conclusion	63
Conclusions Chapitre I (II): Mise au point et évaluation du diagnostic simultané de <i>C. trachomatis</i> et de <i>N. gonorrhoeae</i> par la méthode LiPA	83
RÉSULTATS : CHAPITRE II	84
Chapitre II: Charge virale dans le plasma et les sécrétions cervico-vaginales chez des patientes infectées MST/VIH	85
<i>I. Mise au point de méthodes de détection et de mesure semi-quantitative du VIH dans le plasma et les sécrétions cervico-vaginales</i>	85
A. Principe général de la PCR quantitative appliquée au VIH	86
1. PCR non compétitive.....	86
2. PCR compétitive.....	86
3. Standards utilisés pour la quantification	90
B. Matériel et méthodes.....	90
1. Origine des échantillons	90
2. Préparation des échantillons sanguins et cervico-vaginaux	91
3. Préparation des acides nucléiques des standards	92
4. Conditions de la PCR	94
5. Mesure des signaux PCR et dosage des ADNs	94
C. Mises au point de la méthode	96

1. Choix des amorces.....	96
2. Vérification des contrôles	97
3. Discussion	105
Conclusion Chapitre II (I): Mise au point des méthodes de quantification relative de la charge virale	107
<i>II. Application à l'analyse de l'influence des MST sur la contagiosité du VIH</i>	<i>108</i>
A. Introduction	108
B. Matériel et méthodes.....	108
B. Résultats et discussion	109
1. Détection de <i>C. trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> et <i>T. vaginalis</i> dans les lavages et prélèvements cervico-vaginaux	109
2. Détection du virus et charge virale	110
Conclusion Chapitre II (II): Étude de faisabilité sur l'application des méthodes développées aux recherches sur les interactions MST/VIH	115
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVE.....	116
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	121
ANNEXES	148

Abréviations et anglicismes

A : Adénine
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
ANR : acide ribonucléique
BET : Bromure d'ethyidium
C : cytosine
DEPC : diethyl pyrocarbonate
dNTP : désoxynucléotides
EDTA : éthylène diamine tétra acétique
ELISA : enzyme linked immunosorbent assay
G : Guanine
gag : group antigen
IF : immunofluorescence
Ig : immunoglobuline
kb : kilobase
LCR : ligase chain reaction
LiPA : Line probe assay
MST : maladie sexuellement transmissible
pb : paire de bases
PBMC : cellule mononucléée du sang périphérique
PBS : phosphate-buffered saline
PCR : polymerase chain reaction
RT-PCR : Retro-transcription PCR
SDS : Sodium dodécylsulfate
SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise
SSC : citrate de sodium trisodique
SSPE : phosphate sodique EDTA
T : Thymine
Taq polymérase : ADN polymérase de *thermus aquaticus*
TBE : tris borate EDTA
TE : tris EDTA
Tris : tris (hydroxy-méthyl) amino-méthane
UV : ultraviolets
VIH : virus de l'immunodéficience humaine
VIS : virus de l'immunodéficience simiene

Introduction

Introduction

Le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) est l'une des formes les plus graves de l'expression du dysfonctionnement du système immunitaire chez l'Homme, caractérisé par une atteinte du système lymphatique ganglionnaire dès le début de l'infection, et par l'association de maladies infectieuses, dites infections opportunistes, actives au stade final de la maladie.

Le SIDA est causé par des rétrovirus de 2 types: le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1), responsable de la majorité des cas dans le monde, et le VIH de type 2 (VIH-2), moins fréquent, rencontré principalement en Afrique de l'Ouest.

Le premier cas de SIDA a été décrit en 1981. La maladie a touché principalement l'Afrique sub-saharienne, puis les États-Unis et l'Europe. Depuis, de nouveaux foyers se sont développés sur les autres continents. Le programme de l'O.M.S. pour la lutte contre le SIDA (GPA: Global Program on AIDS) estime, au 1er Décembre 1994, le nombre des cas d'infection à plus de 16 millions. Toujours selon l'O.M.S., le nombre d'individus infectés en l'an 2000 devrait atteindre 25 à 30 millions d'adultes. Les trois quarts des cas d'infection au 1er Décembre 1994 sont situés en Afrique. Mais en Afrique sub-saharienne, la prévalence du SIDA varie selon les régions, et les causes de ces variations n'ont pas été élucidées.

La contamination hétérosexuelle par le VIH est le mode de transmission le plus courant en Afrique sub-saharienne (Piot et coll., 1990). Des études portant sur l'infection par le virus VIH-1 en Afrique ont mis en évidence certains facteurs susceptibles d'influencer sa transmission (Laga et coll., 1993). Ces facteurs peuvent être soit intrinsèques, soit extrinsèques.

Les facteurs intrinsèques de transmission, liés au virus, concerneraient la diversité génétique des virus VIH, et l'existence de plusieurs génotypes ou sous-types

de VIH-1 et -2, qui circulent simultanément en Afrique (Louwagie et coll., 1995; Nkengasong et coll., 1994; Gao et coll., 1994). D'autres facteurs intrinsèques sont liés au système immunitaire de l'hôte. En effet, il y a une suractivation du système immunitaire, due à l'exposition permanente à un grand nombre d'infections bactériennes, virales et parasitaires dès le plus jeune âge (Bentwich et coll., 1995). Ces infections épuisent le système immunitaire, ce qui peut contribuer à l'efficacité de la transmission du VIH.

Les facteurs extrinsèques de transmission, quant à eux, sont d'abord liés aux comportements humains dans certaines conditions sociologiques et économiques, ainsi qu'aux multiples infections locales dues aux maladies sexuellement transmissibles (MST). Les MST sont très répandues en Afrique et présentent un fort taux de complications, un spectre clinique très large et des problèmes de résistance aux antibiotiques. Les données sur la prévalence et l'incidence des MST dans la population générale africaine sont rares. Celles trouvées dans la littérature varient selon les régions, ou se rapportent aux populations ayant un comportement sexuel à haut risque et dans lesquelles la séroprévalence des MST est élevée (Goeman et coll., 1991). De plus, la multiplicité des agents pathogènes responsables des MST, ainsi que les complications et la résistance de ces germes aux traitements, augmentent la complexité du problème dans le cadre d'une multi-infection et dans les interactions avec le VIH. Les MST répandues en Afrique pourraient ainsi participer à l'expansion de la pandémie du SIDA dans les populations hétérosexuelles.

Les MST responsables d'ulcérations facilitent la transmission du VIH par les lésions macroscopiques et microscopiques qu'elles provoquent (Pépin et coll., 1991). Le risque relatif des MST non-ulcératives pour la transmission sexuelle du VIH est plus faible que le risque relatif des MST ulcératives. Cependant, la prévalence plus élevée des MST inflammatoires augmente le risque attribuable à ces mêmes MST de manière générale. Ceci justifie l'intérêt d'étudier de manière plus précise le rôle des MST non-ulcératives.

Dans ce contexte, nous nous sommes fixés pour objectif de rechercher les liens qui pourraient exister entre la transmission sexuelle du VIH et l'infection par les MST de type inflammatoire. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à trois agents des MST non-ulcératifs les plus importantes d'après leur prévalence et leur gravité, responsables d'infections locales. Ces agents sont *Neisseria gonorrhoeae* Neisser 1879, *Chlamydia trachomatis* et *Trichomonas vaginalis* Donné, 1836. Or, les infections qu'ils entraînent sont souvent asymptomatiques et, de ce fait, elles ne sont décelées par les méthodes existantes qu'à des stades cliniques avancés de la maladie.

De manière générale, la contagiosité sexuelle du VIH est liée à la présence du virus dans les sécrétions génitales des individus infectés. En dehors de la réponse immunitaire de l'hôte, la présence du virus dans l'aire génitale peut être aussi bien influencée par les infections locales cervico-vaginales que par la virémie sanguine.

Par conséquent, nous avons jugé nécessaire de mettre au point et d'évaluer des méthodes génétiques sensibles et spécifiques, permettant la détection et l'identification des MST non-ulcératifs dans les sécrétions génitales. Nous avons également été amenés à mesurer la charge virale relative du VIH non seulement dans le sang périphérique, mais aussi dans les sécrétions génitales des personnes infectées. Nous avons aussi examiné l'éventualité de la présence du VIH intégré dans les cellules de ces mêmes sécrétions. Nous avons enfin réalisé une étude sur des personnes co-infectées par le VIH et une ou plusieurs MST inflammatoires, en utilisant les outils que nous avons développés. Ces données préliminaires se situent dans le cadre d'une étude des facteurs de la contagiosité sexuelle du VIH, dont l'objectif concerne l'évaluation de ces facteurs dans le but d'effectuer des interventions en santé publique.

Etat des connaissances

I. Quelques rappels sur le SIDA

A. Prévalence et distribution géographique

Depuis sa première définition au "Center for Disease Control and Prevention" (CDC) aux USA en 1981, le SIDA progresse de manière régulière. Selon les estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S.), au 1er Décembre 1994, environ 4,5 millions de personnes sont déjà atteintes de SIDA, dont plus de trois quarts dans les pays en développement. Le total des cas d'infection, depuis le début de la pandémie au 1er décembre 1994, est estimé à plus de 16 millions, dont 1 million d'enfants. La majorité des individus serait infectée par voie hétérosexuelle, mode de transmission prédominant en Afrique sub-saharienne.

En dépit de cette situation alarmante, la biologie du mode de transmission du VIH est encore mal connue. La période asymptomatique qui s'écoule entre la séroconversion et la maladie dure en moyenne 5 ans. Pendant cette période, les individus séropositifs sont susceptibles d'infecter d'autres personnes. Les projections prévues pour l'an 2000 donnent 10 millions d'orphelins, 40 millions de personnes infectées, et une distribution généralisée à tous les continents. Ceci laisse entrevoir une situation dramatique pour les pays en développement: l'Afrique, mais également l'Asie, où l'incidence de l'infection est actuellement la plus élevée.

B. Le virus VIH

1. Découverte des virus VIH-1 et -2

Après la description des premiers cas de SIDA en 1981, il fallut attendre 1983 pour que le groupe du Pr. Luc Montagnier isole un rétrovirus humain à partir de lymphocytes T de malades atteints de SIDA ou de patients présentant des pathologies associées (Barré-Sinoussi et coll., 1983). L'appellation VIH, pour virus de l'immunodéficience humaine, a été adoptée plus tard. (Gallo et coll., 1984; Levy et coll., 1984). Deux types de rétrovirus ont été définis: le VIH-1 et le VIH-2 (Guyader et coll., 1987).

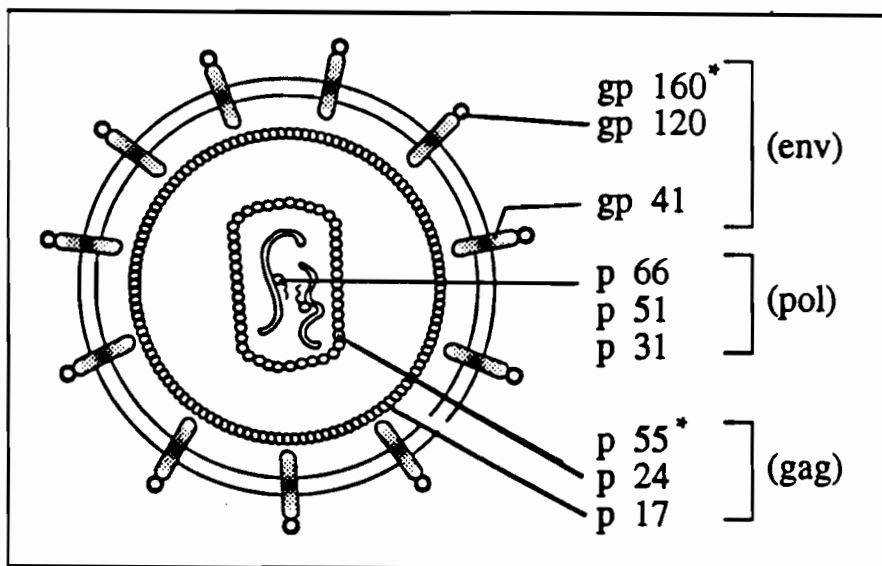


Figure 1: Représentation schématique de la particule virale. Ce schéma donne l'emplacement des antigènes du virus.

2. Structure du génome du VIH-1

Le VIH est un rétrovirus (génome ARN) de la famille des lentivirus (pour "virus lent"), caractérisé par une longue période d'incubation (Bacchetti et coll., 1989). Au microscope électronique à haute résolution, il apparaît comme une sphère d'environ 100 à 140 nm. La particule virale est composée de 60% de protéines, 30 à 35% de lipides, et 1 à 2% d'acides nucléiques. Le virus possède trois gènes codant pour des protéines de structure et enzymatiques: gag pour "group antigen", pol pour "polymerase" et env pour "enveloppe", représentées sur la figure 1. Il existe 6 autres gènes codant pour des protéines de régulation appelés tat, rev, nef, vif, vpr et vpu (un autre gène, tev, n'a été mis en évidence que dans certains isolats de VIH-1). Ces gènes sont encadrés par deux séquences répétées (LTR pour "Long Terminal Repeat") nécessaires à l'expression des gènes viraux. La taille du génome viral se situe entre 9 000 et 10 000 nucléotides. La régulation des gènes ainsi que leur expression sont bien documentées (Benkirane, 1994). La figure 2 donne une représentation schématique du génome viral et des produits des gènes.

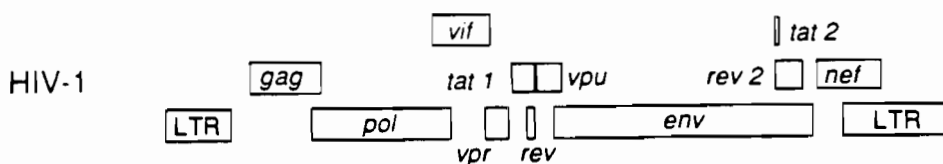


Figure 2 : Représentation schématique du génome du VIH-1

3. Tropisme du virus du SIDA

Une caractéristique importante de l'infection VIH est le tropisme majeur de ce virus pour les cellules immunocompétentes: lymphocytes T CD4+, monocytes/macrophages et cellules dendritiques. Très tôt après la description du SIDA, plusieurs auteurs ont démontré un tropisme sélectif du VIH pour les lymphocytes T CD4+ (Klatzman et coll., 1984; Dalglish et coll., 1984). Des études d'inhibition de la fixation du virus sur les cellules cibles par le CD4 soluble ont établi que la molécule CD4+ est le principal récepteur du VIH (Fischer et coll., 1988; Hussey et coll., 1988).

D'autres cellules, comme les cellules monocytaires qui expriment la molécule CD4, sont peuvent être infectées par le VIH (Gartner et coll., 1990). Leur mode d'infection et le rôle de réservoir de virus qu'elles pourraient jouer sont encore discutés (Gendelman et coll., 1989; McKeating et coll., 1990; Robinson et coll., 1990).

D'autres équipes ont montré que les cellules dendritiques, comme les cellules de Langerhans qui leurs sont apparentées, sont infectables par le VIH (Knight et coll., 1990) et constitueraient un réservoir viral. Ces cellules infectées joueraient un rôle de premier plan dans l'infection des lymphocytes T (Camerone et coll., 1992), ainsi que dans la diminution du nombre des lymphocytes T CD4+ chez les individus infectés (Gerdes et Flad., 1992).

Les cellules gliales et de l'endothélium capillaire du système nerveux central sont également infectables par le VIH (Moses et coll., 1993; Bahat et coll., 1993).

4. Cycle biologique du virus VIH

Le cycle viral, représenté sur la Figure 3, commence par la fixation du virus sur la cellule cible, grâce à l'interaction de la protéine gp120 virale et du récepteur cellulaire CD4; cette interaction est également impliquée dans la formation des cellules géantes multinucléées, appelées syncytia (Schockmel et coll., 1992; Sattentau et coll., 1993).

Les travaux de microscopie électronique ont montré que le VIH pénètre dans la cellule par fusion membranaire (Stein et coll., 1990). L'analyse moléculaire a permis de déterminer les régions de la gp41 et les molécules accessoires impliquées dans la fusion (Chen et coll., 1994; Lazaro et coll., 1994).

Après décapsulation de la particule virale dans le cytoplasme de la cellule hôte, la transcriptase inverse va synthétiser l'ADN complémentaire (ADNc) à partir de la matrice ARN génomique. Le mécanisme de cette rétro-transcription, première arme d'échappement du VIH (par les mutations qu'elle occasionne), a été bien étudié (Barat et coll., 1993).

L'ADN proviral ainsi synthétisé migre dans le noyau sous la forme d'un complexe de préintégration (Stevenson et coll., 1994). L'intégration, qui peut se résumer en trois étapes, débute par le clivage endonucléotidique de l'ADN proviral, suivi du clivage de l'ADN cellulaire et de la ligation des extrémités provirales et cellulaires (Ellison et coll., 1994). Les régions du génome où l'ADN viral s'intègre ne sont pas encore bien déterminées (Pruss et coll., 1994).

La transcription et l'expression des gènes viraux vont dépendre des facteurs de transcription de la cellule hôte. La transcription des gènes commence précocément par les gènes de régulation suivie de l'expression d'autres gènes de taille intermédiaire (Klotman et coll., 1991).

L'encapsidation qui suit commence dans le cytoplasme, par la formation du complexe ribonucléoprotéique dont l'élément principal est la protéine gag (Luban et coll., 1991). Ce complexe migre jusqu'à la membrane cytoplasmique et interagit avec les protéines gp41-gp120 présentes dans cette membrane (Richardson et coll., 1993). Le bourgeonnement est suivi de la maturation des particules virales, caractérisée par l'apparition des protéines gag matures.

Les différentes étapes du cycle de réplication virale, tout comme la transcription des gènes du VIH sont régulées par des facteurs cellulaires, viraux et probablement par d'autres facteurs externes (Gaynor, et coll., 1992).

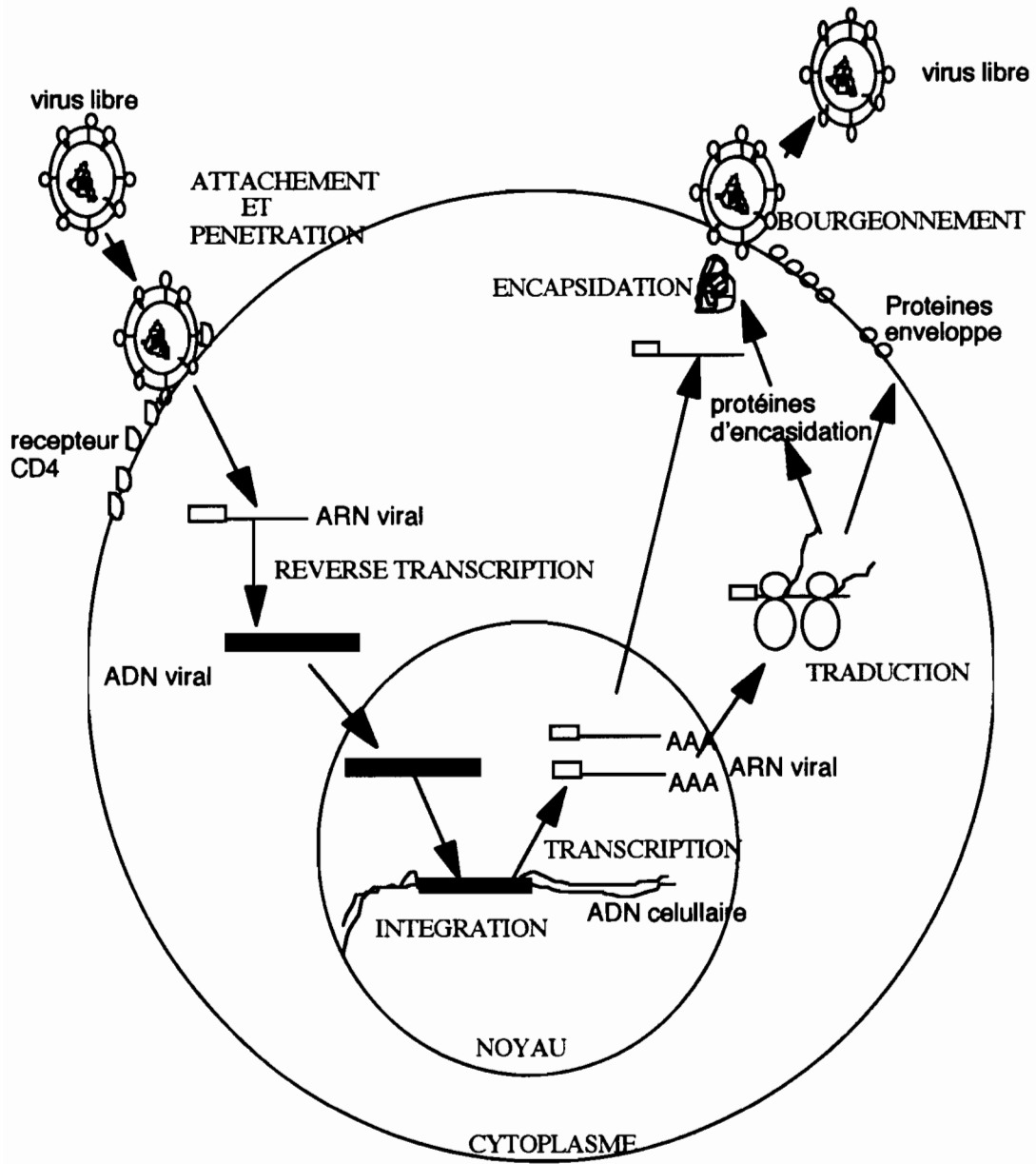


Figure 3 : Représentation schématique du cycle de réplication du VIH-1

C. Rappels sur la physiopathologie du SIDA

Le dysfonctionnement du système immunitaire est généralement associé à des pathologies graves. Le SIDA en est la manifestation clinique la plus sévère. Dans le cas de ce syndrome, l'infection par le VIH s'accompagne d'une hyperactivation cellulaire (lymphocytes T4, T8, monocytes). Cette activité cellulaire est associée à l'accroissement de la charge virale dans le plasma, qui atteint plusieurs milliards de copies (Piatak et coll., 1993a). L'expression des protéines virales à la surface des cellules infectées favorise la formation des cellules géantes multinucléées ou syncytia. Ces cellules géantes permettent la transmission du virus de cellule à cellule, le mettant ainsi à l'abri des anticorps neutralisants. Le désordre de la réponse immune qui s'ensuit s'accompagne non seulement d'une production des cytokines inflammatoires (Clerici et coll., 1993), mais aussi d'une chute progressive des lymphocytes CD4+ (Levy et coll., 1993, Polk et coll., 1987). Pendant que les CD4 baissent, on assiste d'abord à une augmentation de cellules CD8 impliquées dans la réponse cytotoxique (CTL). L'activité CTL diminue ensuite au fur et à mesure jusqu'au stade final de la maladie, où apparaissent les infections opportunistes (Whimbey et coll., 1986, Dei-Cas et coll., 1990).

D. Transmission sexuelle du virus VIH

Le mécanisme par lequel le VIH infecte les cellules vaginales n'est pas bien élucidé. L'inoculation du virus de l'immunodéficience simienne (VIS) au niveau vaginal chez le singe entraîne une infection persistante (Miller et coll., 1989, 1990, 1992b). Les cibles seraient les cellules CD4+, et plus probablement les macrophages de la sous-muqueuse et les cellules de Langerhans (Miller et coll., 1992a, 1992c; Miller, 1992; Pomerantz et coll., 1988, Furuta et coll., 1994, May et coll., 1989).

Sur la base d'études épidémiologiques et biologiques, une hypothèse permettant d'expliquer les événements cellulaires intervenant au cours de la transmission sexuelle du VIH a été proposée. Le virus se lie à la muqueuse vaginale et infecte les cellules cibles que sont les macrophages et les cellules de Langerhans (Ewards et coll., 1985;

Bjercke et coll., 1983; Hackemann et coll., 1968; Morris et coll., 1983; Younes et coll., 1968; Zambruno et coll., 1991, Tan et coll., 1993; Alexander et coll., 1990; Parr et coll., 1990; 1991). Ces cellules migrent vers les ganglions lymphatiques génitaux riches en cellules CD4+ qui initient une réponse immune (Hoefsmit et coll., 1982; Kraal et coll., 1986; Kripke et coll., 1990; Silberberg et coll., 1976; Kupiec-weglinski et coll., 1988; Shelley et coll., 1976, 1977; Steinman et coll., 1991; Patterson et coll., 1987, 1991; Macatonia et coll., 1990; Langhoff et coll., 1991). Le virus piégé par des cellules dendritiques est amené auprès d'autres cellules, principalement les lymphocytes CD4+, où il se réplique. L'ensemble migre vers les ganglions lymphatiques proximaux, regagne la circulation sanguine et le virus peut ainsi infecter d'autres tissus (Figure 4).

Les lésions microscopiques et macroscopiques provoquées par les MST ulcéraives chez les femmes constituent par conséquent une porte d'entrée pour le VIH. En revanche, la circoncision entraîne une protection contre la transmission sexuelle du VIH chez les hommes (Seed et coll., 1995).

Sur ce schéma, tout élément pouvant modifier le portage du VIH au niveau des tissus de la sphère génitale a une importance capitale sur la transmission sexuelle du virus. L'augmentation du nombre de virions et de cellules cibles à ce niveau pourrait accroître l'efficacité de la transmission et de la réplication locale du VIH.

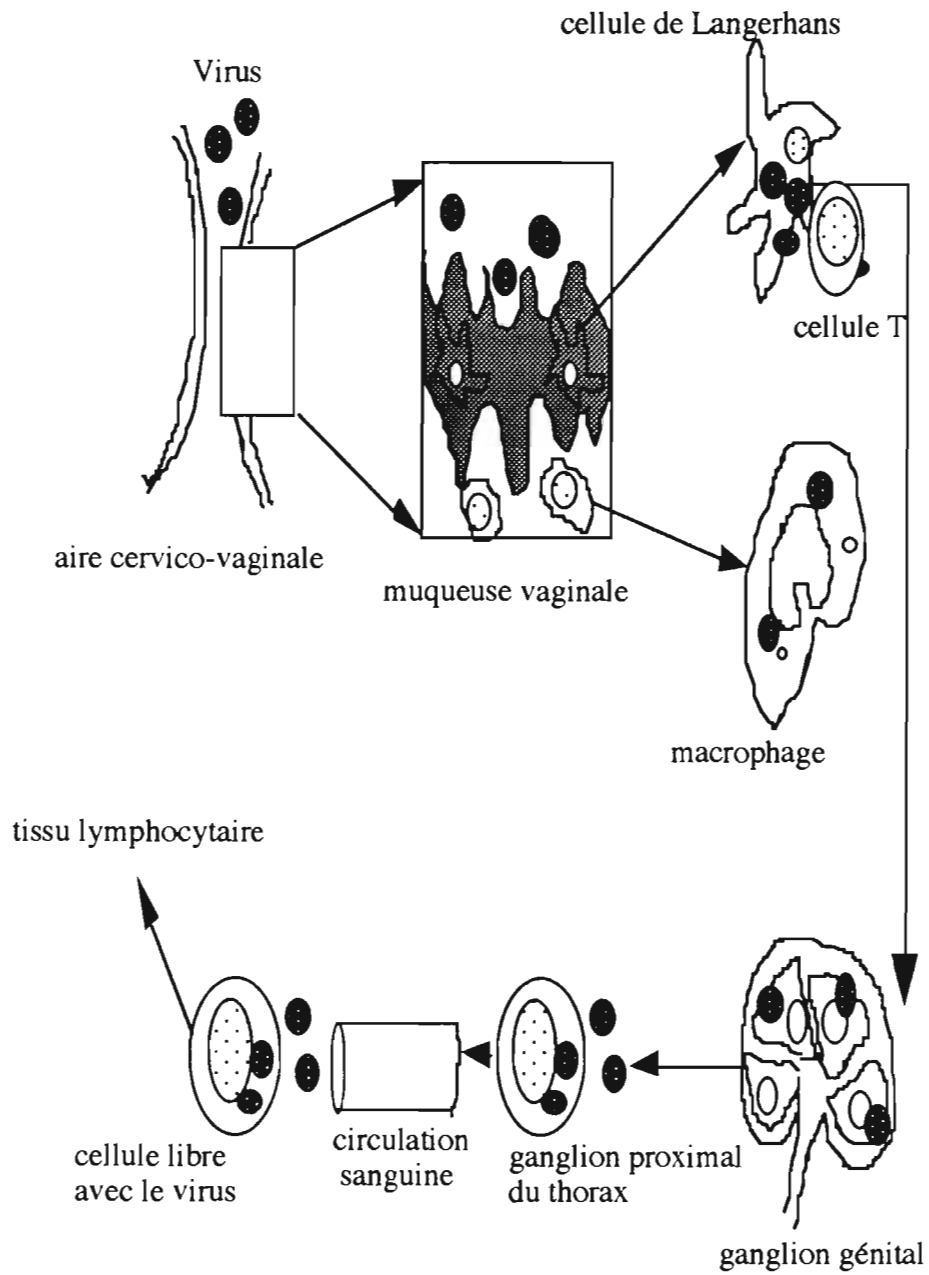


Figure 4 : Mécanisme de la transmission sexuelle du VIH
selon Miller et coll., (1992a).

II. Les principales MST

A. Incidence et distribution géographique des MST

Selon un rapport de l'O.M.S. en 1990, plus de vingt micro-organismes se transmettent en majorité par contact sexuel, et sont responsables d'une cinquantaine de maladies infectieuses (Tableau I). C'est le cas notamment de onze bactéries dont les principales sont *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, *Hemophilus ducreyi* ; de six virus dont le virus de l'herpès, de l'hépatite B, de papillome humain, et le VIH; de protozoaires dont *Trichomonas vaginalis*, des ectoparasites, et des champignons comme *Candida albicans* (Buvé et coll., 1993).

Le chancre mou, les infections à *Chlamydia*, la gonococcie, la syphilis et la trichomonase sont les cinq MST les plus courantes qui peuvent être soignées par antibiotiques. Ces MST sont très répandues dans les pays en développement (Goeman et coll., 1991; De Schryver et coll., 1990; Piot et coll., 1993). En général, les données sur la prévalence et l'incidence des MST dans la population générale des pays africains sont rares, comme nous l'avons illustré dans le Tableau II. De plus, les données dont disposent les spécialistes concernent essentiellement les groupes à risque (Goeman et coll., 1991; Osoba et coll., 1981). Ceci est lié au fait que la reconnaissance des MST en tant que problème de santé publique ne date que des années 1970. Ce problème s'est révélé cependant crucial au lendemain de l'épidémie de SIDA.

Le chancre mou et la syphilis sont les principales MST bactériennes accompagnées d'ulcérations génitales (O.M.S., 1994). Les taux d'incidence dans les pays en développement sont mal connus et varient fortement d'un pays à l'autre (Arya et coll., 1977; De Schamphelleire et coll., 1990; Coughlan et coll., 1977). Le taux d'une sérologie positive syphilitique chez la femme enceinte varie de 1 à 20% en Afrique (Laga et coll., 1994). Selon un rapport du CDC en 1989, l'incidence de la syphilis augmente de nouveau dans les populations défavorisées aux USA (CDC, 1989).

Tableau I : Tableau général des MST selon Siboulet et coll., (1991)

GERME PATHOGÈNE	NOM DE LA MALADIE	ASPECTS CLINIQUES
Bactéries <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (gonocoques)	Blenorragie (gonococcie)	Urétrite purulente, épidi- dymite, cervicite (leucor- rhées), bartholinite, rectite, pharyngite, conjonctivite, salpingite (stérilité, gros- sesse ectopique), périhépa- tite, ophtalmie néonatale, gonococcie disséminée.
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Infections uréthro-génitales à Chlamydia	Urétrite en général subaiguë, épididymite, cervicite, bar- tholinite, rectite, conjoncti- vite, pharyngite, otite, salpingite, périhépatite, pneumonie de l'adulte et de l'enfant, syndrome de Fies- singer-Leroy-Reiter, formes disséminées.
	Lymphogranulomatose véné- rienne Maladie de Nicolas-Favre	Microchancr, adénopathie inguinale, périadénite, complications : esthio- mène, éléphantiasis génital, syndrome ano-rectal.
<i>Mycoplasma hominis</i> <i>Mycoplasma genitalium</i> <i>Ureaplasma urealyticum</i>	Infections uréthro-génitales à mycoplasmes	Urétrite subaiguë, cervicite, salpingite, stérilité.
<i>Haemophilus ducreyi</i>	Chancre mou	Ulcération génitale (peau), adénopathies doulou- reuses, phagédénisme.
<i>Gardnerella vaginalis</i>	Infections génitales féminines à <i>Gardnerella vaginalis</i> .	Leucorrhées, vaginose
<i>Calymmatobacterium granulomatis</i>	Donovanose (granulome inguinal)	Ulcération (amas de bour- geons cicatriciels), masse tumorale, adénopathie. Complications : éléphantia- sis, sténose, phagédénisme.
Shigella Salmonella	Shigellose Salmonellose	Surtout chez homosexuels masculins
Streptocoque du groupe B Bacilles à Gram — (<i>E. Coli. proteus</i> , etc.)	Infections génitales à germes pyogènes	Urétrite subaiguë, vulvo-vagi- nite subaiguë.

GERME PATHOGÈNE	NOM DE LA MALADIE	ASPECTS CLINIQUES
Splrochète <i>Treponema pallidum</i>	Syphilis	Syphilis récente : lésions de la peau et des muqueuses. Syphilis latente. Syphilis symptomatique tardive : gommès, compli- cations cardiovasculaires, nerveuses. Syphilis congénitale.
Protozoaires <i>Trichomonas vaginalis</i>	Trichomonase génitale	Vaginite, urétrite, prostatite.
<i>Entamæba histolytica</i>	Amibiase	Surtout chez homosexuels masculins.
<i>Giardia intestinalis</i>	Lambliaze	Surtout chez homosexuels masculins.
Champignons <i>Candida albicans</i>	Candidose uréthro-génitale	Vulvo-vaginite, balanite, urétrite.
Virus <i>Herpès type 1 et 2</i>	Herpès génital primaire et récurrent	Vésicules peau, ulcérations génitales douloureuses, méningite à liquide clair, encéphalite du nouveau-né.
Virus de l'hépatite B et aussi de l'hépatite A et non A non B	Hépatite aiguë ou chronique	Surtout chez homosexuels masculins.
Cytomégalovirus	Infections génitales à Cytomégalovirus	Malformations infantiles graves, syndrome mononu- cléosique, retard néonatal, surdité.
Papilloma virus	Condylome acuminé (végétations vénériennes) Cancer du col "in situ"	Végétations génitales, papil- lome laryngé du nourris- son. Facteur de dysplasie génitale.
Pox virus	Molluscum contagiosum	Petites papules génitales
Rétro-virus VIH 1 VIH 2	S.I.D.A. (A.I.D.S.)	Manifestations infectieuses di- verses : pulmonaires, intes- tinales, méningées, céré- brales, etc. Adénopathies, lésions cuta- néo-muqueuses, etc. Sarcome de Kaposi.
Ectoparasites <i>Phthirus pubis</i> <i>Sarcoptes scabiei</i>	Phthiriaz Gale	Irritation pubis Prurit.

Les MST de type inflammatoire, notamment les infections à *Chlamydia*, la blennorragie et la trichomonose sont beaucoup plus fréquentes que le chancre mou et la syphilis. Les infections à *Chlamydia* et la gonococcie sont les MST inflammatoires les plus importantes du fait des complications et séquelles qu'elles engendrent. Elles sont les plus répandues avec environ 75 millions de nouveaux cas dans le monde chaque année. La prévalence annuelle de *N. gonorrhoeae* chez les adultes dans les pays africains, estimée entre 1 et 10%, est beaucoup plus élevée qu'en Occident avec par exemple 0,3% en 1980 en Belgique (Arya et coll., 1977; Nzila et coll., 1991; Buvé et coll., 1993). La prévalence en Afrique varie de 1 à 15% dans la population générale, et atteint 50% chez les prostituées (De Schamphelre et coll., 1990). Les infections à *Chlamydia* sont au moins aussi répandues dans les pays en développement qu'en Europe Occidentale (Greenblatt et coll., 1988; Mardh et coll., 1980; Martin et coll., 1982). La trichomonose est extrêmement répandue et toucherait entre 3 et 10 millions de personnes chaque année dans le monde (Alderete et coll., 1995). Dans les pays en développement, on estime de 14,5% à 32% sa prévalence chez les femmes en consultation prénatale (Mabey et coll., 1984, 1987).

Les auteurs admettent qu'il y a une sous-estimation dans les pays en développement, résultant, en partie, de la proportion importante d'infections féminines asymptomatiques. Elle est également liée au manque de moyens de diagnostic adéquats, en particulier pour la détection dans le cas où la charge infectieuse est basse.

Tableau II : Quelques exemples de prévalence des MST chez les prostituées en Afrique (Laga et al., 1990).

Pays	Année	Prévalence (%)				
		Gonorrhée	Infection Chlamydia	Trichomo- nose	Syphilis	Ulcères génitaux
Cameroun	1990	-	-	-	38	-
Kenya	1985	50	25		32	28
Sénégal	1990	16	14	46	30	0,3
Zaïre	1988	23	13	28	18	5

B. Pathologie des MST

1. Pathologie des principales MST ulcératives

La principale cause des ulcères génitaux est le chancre mou qui affecte aussi bien les femmes que les hommes. Cette pathologie, dont l'agent étiologique est *Hemophilus ducreyi*, se manifeste généralement par une ulcération douloureuse et purulente plus ou moins profonde, observée sur les organes génitaux externes; elle peut également se manifester par le gonflement des ganglions lymphatiques de l'aîne.

L'herpès génital et la syphilis sont décrits comme étant des causes importantes d'ulcères génitaux. Les lésions provoquées par ces infections s'accompagnent d'un tableau clinique large (Geoman et coll., 1991).

La clinique de la syphilis, dont l'agent est *Treponema pallidum*, comporte trois stades. Au stade primaire, cette maladie se manifeste par une érosion génitale qui passe souvent inaperçue si elle est interne, avec gonflement de ganglions voisins. Elle peut évoluer vers la phase secondaire caractérisée par l'apparition de taches sur le corps, accompagnées de démangeaisons qui disparaissent en quelques semaines. Au stade tertiaire, un quart des cas non traités évoluent vers un accident cardiaque et neurologique (F.H.I., 1992).

2. Pathologie des MST inflammatoires

Les principales infections de type inflammatoire sont la gonococcie, l'infection génitale à *Chlamydia* et la trichomonase. Les infections à *Chlamydia* et la gonococcie sont importantes à cause de leurs complications et des séquelles sévères qu'elles provoquent chez les femmes et les nouveau-nés.

La gonococcie et les infections uréthro-génitales à *Chlamydia* sont souvent responsables de plusieurs formes d'urétrites, de cervicites, d'épididymites et d'autres aspects cliniques souvent graves. Ces infections sont, dans bien des cas, asymptomatiques, ou paucisymptomatiques chez la femme, et donc difficiles à détecter.

Trichomonas vaginalis, l'un des agents de MST le plus répandu dans le monde, est de loin le moins étudié. Il pourrait être à l'origine d'étiologies et de complications, en particulier chez les femmes enceintes (Wolner-Hansen et coll., 1989; Alderete et coll., 1995; Krieger et coll., 1981). Le nombre de vaginites causées par ce parasite n'est pas connu.

3. Complications des MST de type inflammatoires

La surveillance des MST est pratiquement inexistante dans beaucoup de pays en développement. Ainsi, des complications peuvent apparaître au cours des infections (Muir et coll., 1980; Belsey et coll., 1976). L'inflammation pelvienne, responsable de plus de 40% des hospitalisations dans les services de gynécologie, semble pour la plupart des cas, être due à *N. gonorrhoeae* ou *C. trachomatis*. L'occlusion tubulaire a été diagnostiquée dans près de 50% des cas d'infertilité chez les femmes africaines, alors que ce taux varie de 11 à 20% ailleurs dans le monde. Une étude de l'O.M.S. (W.H.O., 1989) a suggéré que les infertilités, qui touchent jusqu'à 20% de femmes dans plusieurs pays d'Afrique centrale, sont dues à l'inflammation pelvienne causée par les MST. Ces infections jouent aussi un rôle important dans l'étiologie des grossesses ectopiques dans ces pays (Laga et coll., 1986; Schultz et coll., 1987; Datta et coll., 1988).

La morbidité néonatale due aux MST est surtout causée par la syphilis, les infections gonococciques et chlamydiennes chez la mère (WHO, 1991). Dans les pays où les nouveau-nés ne sont pas systématiquement soignés, l'ophtalmie gonococcique néonatale atteint jusqu'à 3% de cas. Elle est associée à une kératite et à une kératoconjonctivite qui peuvent entraîner la cécité (Laga et coll., 1986; De Muylder et coll., 1990; Koumaré et coll., 1993).

4. Quelques exemples de résistance des MST aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques, qui frappe particulièrement le tiers monde, est liée à l'automédication chez les jeunes (W.H.O., 1989; Geoman et coll., 1991).

La résistance la mieux documentée est celle de *N. gonorrhoeae*. La résistance des souches de *N. gonorrhoeae* aux antibiotiques est un problème majeur. Environ 50% des isolats d'Afrique produisent de la pénicillase et sont par conséquent résistantes. Au Mali, sur une population de 280 personnes dont 46,6% sont infectées, une étude récente a démontré la résistance de la totalité des souches (Koumaré et coll., 1993). D'autres souches sont résistantes à la streptomycine et à la tétracycline.

La trichomonase se traite au métronidazole, mais quelques souches sont résistantes à ce médicament. Il faut savoir que les infections à *Chlamydia* et la syphilis se soignent bien si elles sont diagnostiquées rapidement.

La résistance d'*Hemophilus ducreyi* aux médicaments classiques (tétracyclines et sulfamide), les plus utilisés en Afrique, est en progression. En 1988 à Kinshasa (Zaïre), certains travaux ont démontré l'émergence de 10 à 40% d'isolats résistants ou modérément résistants (Goeman et coll.; 1991; De Muylder et coll., 1990).

III. Interaction de l'infection VIH et des MST

Depuis le début de l'épidémie de SIDA, on a constaté une forte prévalence des MST chez les personnes infectées par VIH et une prévalence importante du VIH chez les individus ayant une MST (Piot et coll., 1990; Charmot et coll., 1988). L'explication avancée est que les MST faciliteraient la transmission du VIH. Mais des facteurs comportementaux identiques ont rendu complexe l'étude de ces interactions. La complexité des interactions entre le VIH et les MST favoriserait la diffusion rapide du VIH constatée dans certaines parties du monde (Mertens et coll., 1991). Plusieurs hypothèses sur les modes d'interaction ont été alors proposées: (i) l'infection par les MST augmenterait la transmission du VIH, (ii) l'infection par le VIH modifierait l'histoire naturelle, le diagnostic et l'évolution du traitement des MST, (iii) certaines MST modifieraient l'histoire naturelle de l'infection à VIH et l'évolution vers le SIDA. Ces hypothèses sont représentées sur la figure 5.

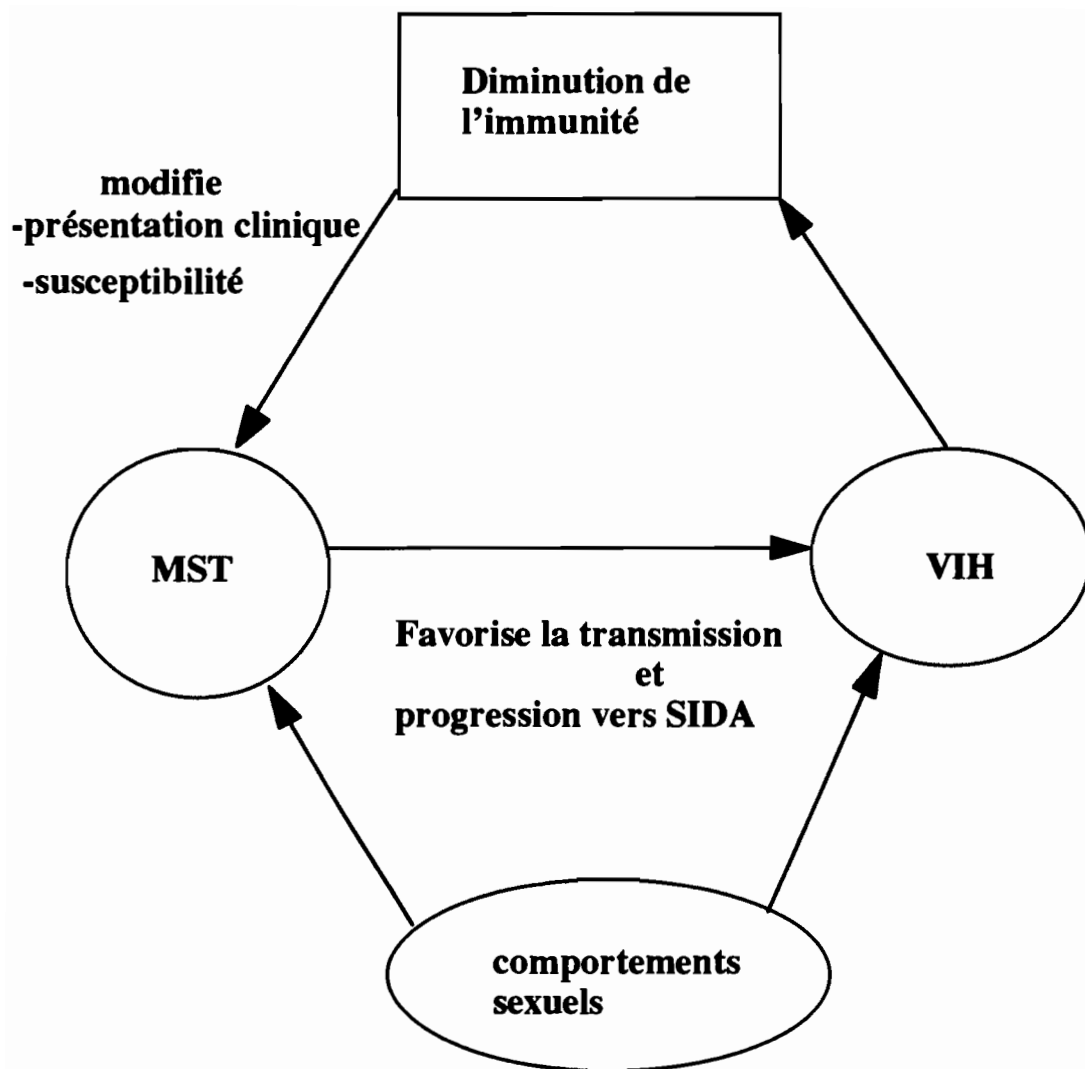


Figure 5 : Interactions entre MST et VIH

A. Impact des MST sur la transmission du VIH

Les études épidémiologiques ont permis d'identifier certains facteurs externes associés à la transmission sexuelle du VIH, en dehors de ceux liés aux virus et à l'hôte. Les plus importants sont les ulcérations génitales et les infections par d'autres MST (Holmberg et coll., 1988; Plummer et coll., 1991; Holmes et coll., 1990).

1. MST ulcératives

De nombreuses études, notamment en Afrique, ont démontré que les ulcères génitaux (syphilis ou herpès génital) augmentent les risques de transmission sexuelle du VIH (Pépin et coll., 1991, 1992). Ainsi, la présence du chancre mou multiplie par cinq le risque de transmission du VIH (Simonsen et coll., 1988). Des études épidémiologiques faites à Nairobi (Kenya) ont démontré que les hommes infectés par le VIH avaient eu plus souvent des ulcères génitaux que ceux qui n'étaient pas infectés par le virus. Parmi les prostituées, le risque de contamination est dix fois plus élevé chez celles ayant un ulcère par rapport à celles qui sont indemnes. On pense que les ulcères génitaux sont la principale voie d'entrée du VIH et qu'ils accroissent la production de cellules infectées dans les sécrétions vaginales. Des études prospectives chez les prostituées et leurs partenaires ont montré que les ulcères génitaux favorisent la séroconversion VIH (Laga et coll., 1993, 1994).

2. MST non-ulcératives

De manière générale, les MST non-ulcératives sont suspectées comme facteurs de risque pour la transmission sexuelle du VIH. Plusieurs études portant sur des prostituées en Afrique ont montré que l'infection à *C. trachomatis* et à *T. vaginalis* au Zaïre est associée à l'infection par le VIH (Laga et coll., 1990). Une étude prospective sur des prostituées à Nairobi (Kenya), indique que l'infection à *C. trachomatis* est associée de façon indépendante à la séroconversion à VIH. Le traitement médical de ces

MST constituerait une stratégie intéressante pour la prévention du SIDA (Laga et coll., 1993, 1994).

L'inflammation associée à ces MST peut avoir deux sortes d'interactions sur la transmission du VIH: (i) d'une part en augmentant le groupe de cellules cibles potentielles au niveau génital chez les personnes infectées par les MST, et (ii) d'autre part en augmentant le nombre de cellules infectées par le VIH dans les sécrétions génitales des individus infectés. Afin de mieux comprendre le rôle de ces infections urogénitales, il est nécessaire de les détecter précocément.

B. Autres facteurs influençant la transmission du VIH

Certains facteurs sont liés aux moeurs et aux comportements sexuels comme l'utilisation des contraceptifs oraux, l'ectopie cervicale, la circoncision et la nature des rapports sexuels (Plummer et coll., 1991, 1994; Moss et coll., 1991; Kreiss et coll., 1994; Piot et coll., 1990; Vogt et coll., 1986, 1987; Moses et coll., 1990; Seed et coll., 1995).

Le stade de la maladie SIDA semble jouer également un rôle important. En effet, pendant la phase primaire d'infection, le titre des anticorps et la virémie plasmatique sont élevés (Clark et coll., 1991; Goudsmit et coll., 1986; 1987; Kutteh et coll., 1990; Miller et coll., 1992a), et cette virémie est théoriquement associée à une charge virale élevée dans les sécrétions vaginales. Dans les sécrétions génitales, y compris le sperme, le VIH qui se trouve sous sa forme libre ou intégré dans les cellules infectées a pu être isolé (Anderson et coll., 1990, 1992; Zagury et coll., 1984; Kreiger et coll., 1991; Hénin et coll., 1993; Clemetson et coll., 1993).

C. L'impact de l'infection VIH sur les MST

L'infection VIH, en agissant sur le système immunitaire de l'hôte, pourrait théoriquement affecter les MST selon plusieurs voies: (i) l'infection VIH peut modifier l'incidence des MST; (ii) elle peut être à l'origine des formes cliniques atypiques (lésions plus importantes) ; (iii) elle peut modifier les caractéristiques cliniques de

autres MST. Ceci pourrait alors aboutir: au développement plus rapide des complications, à des résultats aberrants aux tests de laboratoire, et à une standardisation théorique inadéquate.

D'après les résultats de travaux effectués dans certains pays d'Afrique, la fréquence des lésions dues à l'herpès génital est en nette augmentation. Sans des études prospectives sur la séquence des événements au cours des infections, il est impossible de dire si le niveau élevé de l'infection par les MST dans la population générale peut faciliter la transmission du VIH, ou si les MST sont simplement des marqueurs de l'immunodépression due au VIH (Laga et coll., 1993, 1994).

1. L'impact de l'infection VIH sur les MST non-ulcératives

Les effets de l'infection VIH sur les MST non-ulcératives concernent les manifestations cliniques subies au niveau génital et la baisse de sensibilité des infections aux moyens thérapeutiques existants. Le nombre moyen de rechutes est significativement plus important chez les individus infectés par le VIH par rapport aux individus VIH négatifs. L'impact de l'infection VIH sur les condylomes génitaux est mieux documenté. Une étude sur les prostituées VIH positives par rapport aux cas témoins à Kinshasa (Zaïre) a démontré que les condylomes ont une incidence plus élevée chez les patientes séropositives (Malele et coll., 1991; Laga et coll., 1993, 1994). D'autres effets pourraient concerner les anomalies cytologiques et histologiques au niveau des prélèvements anaux et cervicaux (Feingold et coll., 1990).

Pour ce qui concerne les infections gonococciques, les infections à *Chlamydia* et la trichomonase, aucune étude ne signale un rôle de l'infection VIH sur la présentation clinique, le diagnostic et la résistance aux traitements de ces maladies.

2. L'impact de l'infection VIH sur les MST ulcératives.

Les études effectuées jusqu'à présent montrent que les ulcères génitaux sont plus fréquents chez les individus séropositifs par rapport aux individus séronégatifs exposés aux mêmes risques sexuels (Pépin et coll., 1992; Stamm et coll., 1988).

La réussite du traitement contre le chancre mou, principal responsable des ulcères génitaux à Nairobi (Kenya), est en recul. L'échec du traitement peut être multiplié par six chez les individus VIH positifs par rapport aux individus VIH négatifs (Malele et coll., 1991). Chez les individus VIH positifs, on observe des ulcérations herpétiques larges, chroniques et persistantes ainsi qu'une résistance à l'Aciclovir™ (antiviral). Plus les individus séropositifs atteints d'herpès sont traités à forte dose avec l'Aciclovir, plus on obtient des souches résistantes (Youle et coll., 1988; Erlich et coll., 1989).

Les travaux sur l'impact de l'infection par le virus VIH sur la syphilis ont laissé paraître de nouveaux cas de présentation clinique atypique de la syphilis (Hook et coll., 1989). Chez les individus séropositifs, quelques cas de résistance au traitement par la benzathine et la pénicilline ont été observés. Des études plus approfondies concernant l'évaluation clinique sur des patients VIH, infectés par *T. pallidum*, devraient éclaircir la complexité de la problématique au cours de ces co-infections.

IV. L'Immunité des muqueuses et le VIH

A. La réponse anticorps de la muqueuse

Les muqueuses sont capables de produire des immunoglobulines (Ig) sécrétoires de type IgG et IgA sous forme dimérique (Kutteh et coll., 1988, 1990; Rebello et coll., 1975). La présence d'Ig dans les sécrétions utérines est régulée par la production hormonale (Wira et coll., 1977) et par les inflammations locales. Les IgA sécrétoires sont plus importantes que les IgG (Coughlan et coll., 1977) et sont produites à 90% par les muqueuses (Kutteh et coll., 1990; Lehner et coll., 1992). Les anticorps neutralisants du virus à la surface de la muqueuse peuvent avoir une importance capitale dans la prévention des infections locales (Janoff et coll., 1989). On pense que les IgA (IgA2) sécrétoires dans la muqueuse pourraient empêcher l'attachement des virus aux cellules épithéliales et ainsi bloquer leur pénétration (Dimmock et coll., 1984).

Ainsi dans le modèle du virus d'influenza, on a mis en évidence une protection de la muqueuse par les anticorps neutralisants (Taylor et coll., 1989).

Chez les patients sidéens, le titre des immunoglobulines IgA décroît jusqu'au niveau des IgG (Janoff et coll., 1989; Jackson et coll., 1990). Il a été montré qu'un niveau insuffisant de IgA2 pourrait rendre les patients sidéens vulnérables aux infections de la muqueuse par les bactéries produisant des protéases contre les IgA (Masur et coll., 1981 ; Siegal et coll., 1981; Polsky et coll., 1986). La muqueuse endommagée contribue à la vulnérabilité de certains patients à ces agents.

Des travaux d'infection par le virus de l'immunodéficience simienne (VIS) suggèrent que les singes macaques Rhésus chroniquement infectés par le VIS ont un système immunitaire anormal au niveau de leurs muqueuses (Miller et coll., 1992c; Marthas et coll., 1992; Vahne et coll., 1991). Cet état anormal, que l'on retrouve chez les patients sidéens, est souvent caractérisé par une hyper gammaglobulinie (Aucouturier et coll., 1986; Forrest, 1991). Cela pourrait expliquer, en partie, la pathogenèse des infections opportunistes au niveau des revêtements de type respiratoire, gastro-intestinal et génital.

Le système immunitaire des surfaces membranaires génitales joue un rôle essentiel pour la protection contre l'expansion des MST, y compris le SIDA. Cependant, dans le cadre d'une perspective vaccinale, peu d'études sont faites sur les anticorps neutralisants du VIH dans les sécrétions vaginales, pouvant empêcher la transmission sexuelle du virus (Parr et coll., 1990; Miller et coll., 1994; Scultz et coll., 1994).

B. La réponse cellulaire cytotoxique (CTL) des muqueuses

L'immunité à médiation cellulaire implique en général deux types cellulaires: les cellules CD4+ et les cellules CTLs (CD8+ essentiellement). Les cellules CD4+ et CD8+ produisent des cytokines qui activent les macrophages, responsables de la destruction des agents infectieux internes (Davies et coll., 1981; Ernest et coll., 1984, 1985, 1986; Guy-Grand et coll., 1978; McDermott et coll., 1980, 1984; Nauss et coll., 1984; Klein et coll., 1984, 1985).

Après une immunisation intravaginale de souris par le virus d'herpès vivant atténué, ces souris ont été protégées contre une transmission génitale du virus HSV virulent avec une réponse CTL très forte (McDermot et coll., 1984, 1989, 1990; Mairimann et coll., 1984). De fortes réponses CTL anti-VIH ont été obtenues en Gambie sur des prostituées répétitivement exposées mais non infectées par le VIH (Rowland-Jones et coll., 1995). Une forte réponse CTL anti-nef a été évoquée pour expliquer une protection efficace contre la transmission sexuelle du VIH-1 au sein de couples discordants (Langlade-Demoyen et coll., 1994). Il apparaît que l'activité CTL est la première ligne de défense contre une infection à VIH. De la même manière, une protection par réponse CTL a été mise en évidence au cours de l'infection par *Chlamydia trachomatis* chez la souris (Stambach et coll., 1994).

Au stade SIDA, on a observé une baisse des cellules CD4+ dans les muqueuses des personnes infectées ou malades (Budhrajá et coll., 1987; Rogers et coll., 1986).

V. Les outils de diagnostic des MST (et du VIH)

Les maladies sexuellement transmissibles sont souvent diagnostiquées, comme toutes les maladies infectieuses, chez des patients symptomatiques, c'est-à-dire au moment où les individus ont une charge infectieuse élevée. De manière générale, les diagnostics sont faits par des méthodes de visualisation des formes infectieuses, colorées ou non.

Dans le cas du SIDA, il est conseillé de faire le diagnostic précoce des maladies associées, pour déterminer la possibilité d'effectuer des traitements prophylactiques. La PCR, et d'autres techniques, sont aujourd'hui des méthodes candidates pour cet objectif.

A. Diagnostic de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *T. vaginalis*

1. Diagnostic de laboratoire des infections à *N. gonorrhoeae*

Dans le cas de l'urétrite aiguë chez l'homme (hôte naturel de *N. gonorrhoeae*), le diagnostic peut être fait par examen microscopique d'une goutte de pus étalée sur lame après par coloration gram. Chez la femme, l'examen direct des frottis endocervicaux ne permet de faire le diagnostic de gonococcie que seulement dans 40 à 60% des cas. L'isolement par culture est indispensable (Panke et coll., 1991). Cependant, la faisabilité de la culture comme moyen de diagnostic de la gonococcie est liée à une série de facteurs comme le nombre de sites prélevés, la technique de prélèvement, le mode et la durée de transport au laboratoire, et le milieu de culture (Van Dyck et coll., 1994). Toutefois, il est indispensable de confirmer le diagnostic d'une colonie par réaction antigénique ou enzymatique.

Bien que la culture reste la méthode de référence, elle ne détecte pas tous les cas d'infections gonococciques (Van Dyck et coll., 1994).

2. Diagnostic de laboratoire des infections à *C. trachomatis*

Le diagnostic peut se faire par la méthode d'immunofluorescence directe. Des trousseaux complètes telles que le Micro Trak (Syva) et Chlamydia Set (Ortho Diagnostics) existent sur le marché. La méthode la plus habituellement utilisée pour le diagnostic des infections à *C. trachomatis* est la technique de culture sur couche cellulaire utilisant les cellules McCoy (fibroblastes de souris), ou les cellules Héla 229 (cellules épithéliales malignes humaines) en milieu MEM (Larson et coll., 1986; Mahony et coll., 1985). D'autres trousseaux sont actuellement disponibles pour la détection de l'antigène chlamydien dans les échantillons cliniques par une technique ELISA (Cui et coll., 1991). Mais la haute prévalence de taux d'anticorps anti-chlamydia dans différentes populations sexuellement actives limite l'utilisation de la sérologie pour le diagnostic (Van Dyck et coll., 1994).

3. Diagnostic de laboratoire des infections à *T. vaginalis*

T. vaginalis, responsable de certaines formes de vaginites, provoque rarement une infection symptomatique chez l'homme. Lorsqu'on suspecte cliniquement une trichomonase, le diagnostic doit être confirmé par un examen microscopique des sécrétions, et/ou par une culture (Diamond, 1957; Krieger et coll., 1981; 1988, 1992). La culture du micro-organisme demeure à ce jour la méthode de diagnostic clinique la plus sûre.

4. Les nouvelles méthodes génétiques

Les méthodes classiques précédentes sont souvent peu sensibles, en particulier lorsque la charge d'agent infectieux est faible. Ces diagnostics de laboratoire pour les MST sont lourds et difficiles à réaliser. Afin de pouvoir améliorer le seuil de détection du diagnostic, des méthodes génétiques, rendues possibles grâce aux développements de la biologie moléculaire, ont été élaborées. Il s'agit d'une part de l'utilisation de sondes génomiques et d'autre part, de l'amplification génétique de séquences spécifiques des espèces. L'utilisation de ces nouveaux tests permettra de mieux répondre aux questions épidémiologiques et de pathogénèse.

Des méthodes d'amplification par PCR ont été testées pour *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, et *T. vaginalis*. (Lee et coll., 1995; Birkenmeyer coll., 1992; **Kengne et coll., 1994**). Le test Amplicor pour *C. trachomatis*, et le test de "ligase chain reaction" (LCR) qui vise à détecter *C. trachomatis* dans les urines, sont commercialisés (Chapin-Robertson, 1993; Lee et coll., 1995; Schachter et coll., 1991; Pao et coll., 1987; Bobo et coll., 1991).

Des études épidémiologiques menées en Afrique ont démontré que, dans les populations à risque, les individus sont souvent co-infectés par plusieurs MST (Koumaré et coll., 1993; Mabey et coll., 1987). De plus, les infections à *Chlamydia* et à *Neisseria* ont des signes cliniques semblables. Actuellement, un test multiplex, qui permettra de détecter simultanément et de différencier *C. trachomatis* et *N.*

gonorrhoeae , est en cours d'expertise et devrait être commercialisé prochainement (Innogenetics, Belgique).

B. Diagnostic du VIH et quantification virale

1. Diagnostic de laboratoire du VIH

La détection du VIH constitue un aspect important dans les stratégies visant à stopper la propagation de l'infection VIH et de la maladie SIDA. Comme pour d'autres agents infectieux, des méthodes de détection directe et indirecte du virus sont utilisées en laboratoire (Quinn et coll., 1986; Barin et coll., 1985; Clavel et coll., 1987).

Dans la plupart des cas, les anticorps anti-VIH sont détectables par ELISA 1 semaine après l'infection (Denis et coll., 1988; Van de Perre et coll., 1988; Berry et coll., 1991; Leonard et coll., 1991). D'autres techniques comme l'agglutination et l'immunofluorescence indirecte existent. Ces techniques sont parfois plus rapides que les méthodes directes mais elles demeurent moins sensibles.

Les tests de confirmation par la méthode de Western-blot sont indispensables pour confirmer les tests de dépistage aux anticorps anti-VIH.

Les méthodes de détection directe du virus consistent en l'isolement viral, l'amplification de fragments du provirus intégré, ou la mesure de l'antigénémie par ELISA. La croissance virale est détectée dans le surnageant de culture par l'activité de la réverse transcriptase ou par la production de l'antigène p24 (McDougal et coll., 1985; Lee et coll., 1988). L'amplification génomique par "polymerase chain reaction" (PCR) est l'un des plus récents acquis de la biologie moléculaire. Cette technique apparaît aujourd'hui comme la méthode d'avenir pour le diagnostic des agents infectieux. Pour le diagnostic du VIH, les amorces sont choisies dans les régions conservées de gag, pol, et env (Ewards et coll., 1989; Laure et coll., 1988; Lifson et coll., 1990; Ou et coll., 1988; Paterlini et coll., 1990). A côté de l'amplification d'ADN proviral, intégré dans le génome de l'hôte, se développent des techniques de mise en évidence de l'ARN viral plasmatique (Ottmann et coll., 1991). Ce matériel est amplifié après rétro-transcription en ADN par une enzyme, la réverse transcriptase.

Chez le nouveau-né, la présence d'IgG maternelles ayant passé la barrière placentaire empêche l'utilisation des tests sérologiques classiques. Plusieurs approches diagnostiques sont possibles: la recherche directe du virus après mise en culture, l'amplification génomique ou encore la mesure de l'antigénémie. La sensibilité et la spécificité de ces techniques varient selon l'âge de l'enfant.

2. Méthodes de quantification virale

Plusieurs marqueurs immunologiques et sérologiques ont été utilisés dans le suivi clinique au cours des essais thérapeutiques anti-VIH. Ce sont des méthodes de mesure de la p24 par ELISA et du nombre de cellules CD4+, ainsi que des méthodes de culture virale à partir des cellules du sang périphérique (Cohen et coll., 1992; Coombs et coll., 1989; Ho et coll., 1989). Les analyses avec ces marqueurs ont révélé les limites de leur sensibilité et une certaine variabilité des résultats dans le suivi des malades traités par des anti-rétroviraux. Ce niveau de sensibilité est encore plus faible chez les individus asymptomatiques (Saag et coll., 1993; Paul et coll., 1987). De ce fait, les méthodes génétiques, développées pour la détection du VIH, ont été utilisées et adaptées pour la quantification virale.

Des techniques beaucoup plus directes ont été développées récemment. Il s'agit de déterminer la charge virale plasmatique par fixation du virus libre, et amplification en cascades du signal par des réactions lumineuses (Cao et coll., 1992; Verhofstede et coll., 1994; Lin et coll., 1994; Dewar et coll., 1995). Ces méthodes sont encore d'un coût extrêmement élevé. De plus, elles doivent être bien standardisées avant toute utilisation en clinique, en particulier pour la cohérence des données obtenues. Elles doivent également être adaptées à la quantification de charges virales basses, mais aussi permettre d'accéder à tous les génotypes.

La quantification virale par PCR a permis d'établir non seulement une relation entre la charge virale dans le sang et le stade de la maladie (Michael et coll., 1995; Daar et coll., 1995), mais aussi une relation entre le traitement antiviral et la charge virale dans le sang périphérique (Winters et coll., 1992; Cao et coll., 1992; Escaich et coll., 1991; Holodny et coll., 1991; Semple et coll., 1991; Scaden et all., 1992; Piatak et coll., 1993ab; Gemen et coll., 1993). Mais en ce qui concerne le rôle que peuvent jouer les MST sur la présence du VIH dans les sécrétions des muqueuses, peu de travaux ont été publiés.

Objectifs

OBJECTIFS

Objectif général

*Etudier le rôle des principales MST inflammatoires
sur la transmission sexuelle du VIH*

Objectifs spécifiques

*I - Mise au point de méthodes de diagnostic sensibles et spécifiques
pour la détection simultanée des infections locales: implications
épidémiologiques*

*II - Mise au point de méthodes semi quantitatives du VIH dans le
plasma et les sécrétions cervico-vaginales*

*III - Analyse de l'influence des MST sur la contagiosité sexuelle du
VIH dans plusieurs populations africaines*

Résultats : chapitre I

Chapitre I :

Mise au point des méthodes génomiques pour le diagnostic des MST inflammatoires

Les séquences publiées pour *Trichomonas vaginalis* ne nous semblaient pas être les mieux adaptées dans un but diagnostique par "polymerase chain reaction" (PCR). Nous avons donc recherché, dans le génome du parasite, des séquences cibles pour une telle PCR. L'analyse des séquences nucléotidiques de *Chlamydia trachomatis* et de *Neisseria gonorrhoeae* a permis de déterminer des amorces pour effectuer un diagnostic par cette technique de ces deux infections.

Dans un deuxième temps, nous avons recherché des conditions de PCR permettant de réaliser la détection simultanée de ces 3 infections, par une réaction d'amplification dite "PCR multiplex". Pour améliorer sa sensibilité, et surtout la possibilité de tester plusieurs prélèvements au cours d'une même expérience, nous avons développé, en partenariat avec Innogenetics (Belgique) et faisant appel à notre savoir faire sur la PCR, le "Line Probe Assay" (LiPA), imaginé par cette entreprise.

I. Mise au point du diagnostic PCR direct de *Trichomonas vaginalis* sur prélèvements cervico-vaginaux (Publication n°1)

La trichomonase est l'une des maladies sexuellement transmissibles la plus répandues dans le monde (Goeman et coll., 1991). Des travaux récents ont montré que *Trichomonas vaginalis* pourrait favoriser l'infection par le VIH (Laga et coll., 1993). Dans ce contexte, il est nécessaire de détecter ces parasites dès le début de l'infection, afin d'effectuer un traitement prophylactique pour éviter cette facilitation.

Les méthodes classiques (observation microscopique et culture) ne permettent pas de détecter tous les cas d'infection. De plus, la détection multiplex par PCR ou par LiPA, qui est notre objectif à terme, nécessite la recherche d'amorces spécifiques à partir de l'ADN du parasite.

I.1. Culture et Préparation des ADNs

A. Introduction

La mise en oeuvre d'outils diagnostiques sensibles comme la PCR nécessite l'extraction des acides nucléiques. Or, *Trichomonas vaginalis* est riche en nucléases. Afin d'améliorer le rendement d'extraction de l'ADN non dégradé à partir d'une culture massive de ce parasite, il nous a paru important d'utiliser des cultures générant une faible mortalité d'organismes. Pour ce faire, nous avons dû déterminer les conditions optimales de culture. Il était aussi important de trouver une méthode d'extraction des acides nucléiques dans des conditions inactivantes pour les nucléases.

B. Matériel et Méthodes

1. Souches et origine des prélèvements

Les isolats de *T. vaginalis* utilisés pour cette étude proviennent de 3 sites: (i) Laboratoire de Parasitologie, Centre Hospitalier Universitaire, Rouen, (ii) American Type Culture Collection (ATCC), USA, (iii) Laboratoire Rétrovirus, ORSTOM, Montpellier. Ces isolats ont été obtenus à partir de prélèvements vaginaux et urétraux de femmes en consultation hospitalière.

2. Culture des parasites et cinétique de croissance

La mise en culture des exsudats est pratiquée dans un incubateur à 5% CO₂ sur milieu de Diamond intact ou modifié, préchauffé à 37°C avant ensemencement. Les cultures sont entretenues par repiquage toutes les 48 heures dans le milieu de Diamond (Diamond et coll., 1957).

Plusieurs densités parasitaires et différents volumes de culture ont été essayés afin d'établir les conditions optimales pour obtenir une courbe de croissance observée dans ce type de culture. Pour ce qui est de la cinétique de culture, nous avons vu qu'une concentration de 5.10^4 *T. vaginalis* dans 100 μ l de milieu de culture dans une plaque de 96 puits pour le développement de la culture.

La thymidine tritiée (^3H Thy) est une molécule radioactive qui peut être incorporée dans les nouveaux brins d'ADN, synthétisés au cours de la réplication. On peut ainsi mesurer indirectement la croissance parasitaire. La quantité optimale de ^3H Thy ajoutée à chaque puits est déterminée pour la densité parasitaire et le volume réactionnel à partir d'une gamme d'activités spécifiques de la radioactivité établie au préalable. Ici, nous avons utilisé 1 μCi pour 100 μ l de milieu de culture avec 10^4 *T. vaginalis*.

La croissance parasitaire peut aussi être directement mesurée par comptage sur lame des parasites au microscope, après coloration de Giemsa.

3. Préparation de l'ADN de départ

L'ADN de *T. vaginalis* est extrait selon une méthodologie élaborée à partir de celle décrite par Riley et coll., (1992).

Un culot de 10^8 parasites est resuspendu dans un mélange de 2 ml de PBS et de 40 μ l de diethyl pyrocarbonate (DEPC) et incubé dans la glace pendant 5 min. 20 μ l de tampon de lyse sont ajoutés à l'extrait. Cette suspension est mélangée et centrifugée à 900 g pendant 3 min à 4°C. Le culot est resuspendu dans une solution de mélange de 0,5 ml d'EDTA 0,5 M et SDS 0,1%, et ensuite digéré avec 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de protéinase K. L'extraction au phénol-chloroforme et la précipitation sont effectuées ensuite selon le protocole décrit par Maniatis et coll., (1982). L'ADN séché est resuspendu dans 0,5 ml de Tris HCl 5 mM, pH 8,0.

C. Résultats

La courbe de croissance des souches utilisées est donnée dans la Figure 1a. Sur cette figure, on observe une baisse du nombre des parasites au cours des deux premières heures (adhérence), suivie par une phase de croissance exponentielle, puis une chute brutale de la courbe due à la mort des parasites. La durée de chaque phase est différente, comme l'ont décrit Gelbart et coll., (1990). La densité parasitaire atteint son maximum 16 heures après inoculation dans le milieu de Diamond. Les parasites inoculés sont obtenus à partir d'une culture avec peu d'organismes morts. En effet, il est important de décanter les cultures 4 heures après l'inoculation pour éliminer les cellules mortes, car les parasites qui adhèrent au fond des boîtes sont vivants. Huit heures après l'addition d'un volume de milieu de culture frais, les parasites sont inoculés dans 100 ml de milieu de Diamond. Les cultures sont récoltées à 6, 10, 20, et 24 heures.

Après extraction, la même quantité d'ADN de chaque stade de la culture est déposée sur un gel d'agarose 1%. Les profils obtenus varient selon le stade de la cinétique. On peut remarquer que les ADNs sont de plus en plus dégradés en fonction du temps. Ceci se traduit par le dégradé observé sur la Figure 1b à partir de 20 heures de culture. L'extraction à froid ne modifie pas de façon importante le profil d'ADN sur le gel d'agarose.

Nous avons pu observer que les conditions optimales pour obtenir de l'ADN non dégradé correspondent à 12 heures de culture, dans les conditions précédemment décrites.

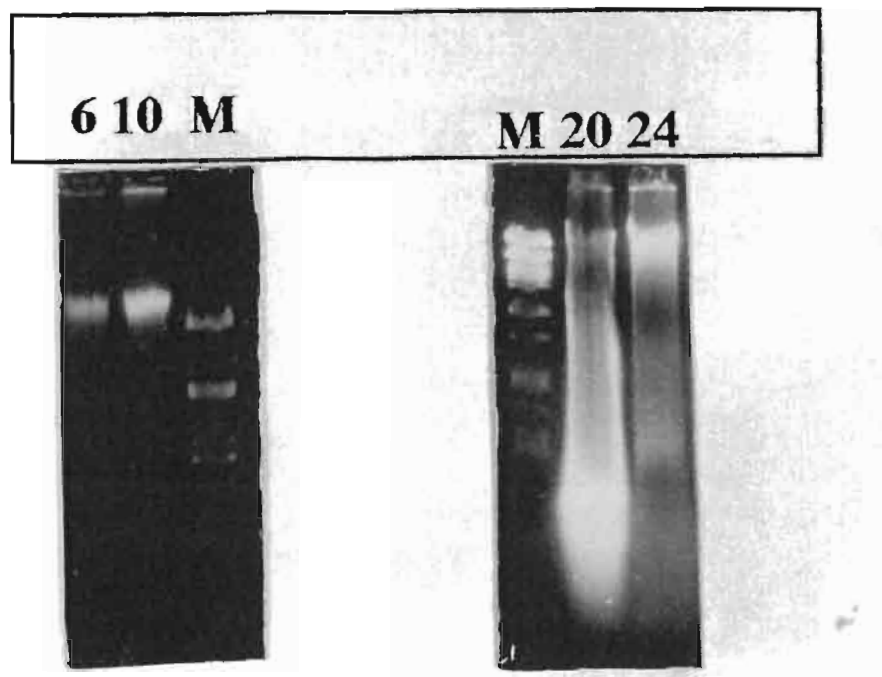
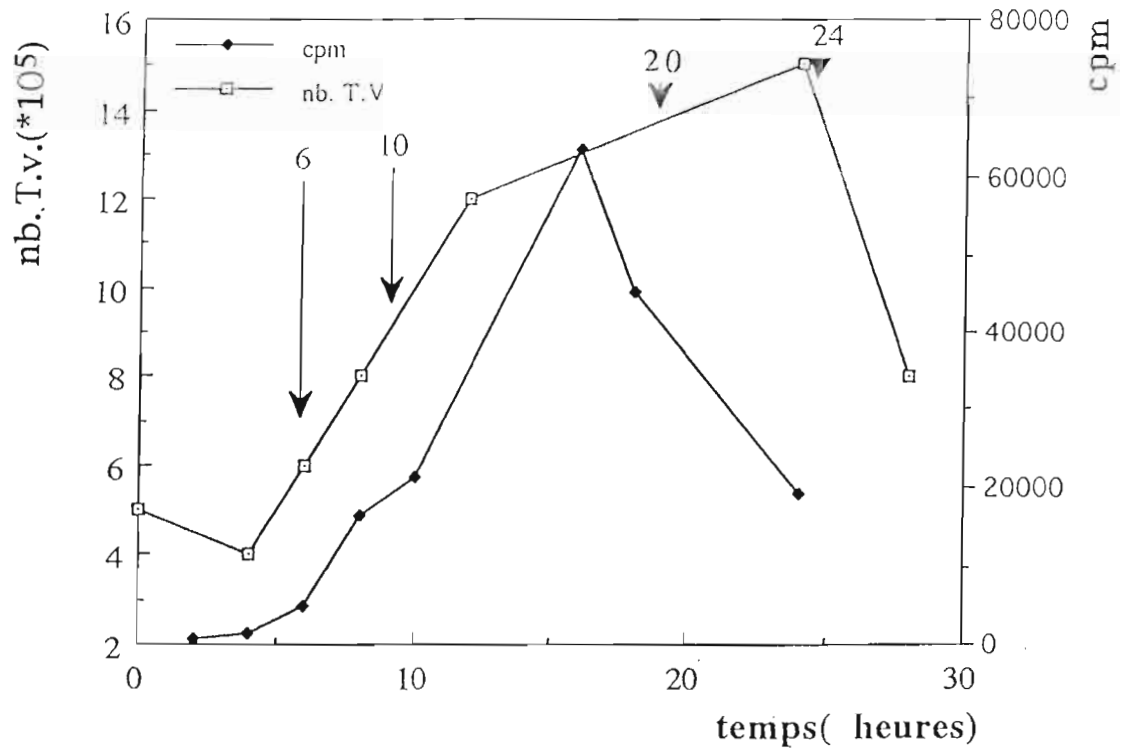


Figure 1: (A) Cinétique de prolifération de *T. vaginalis* mesurée par incorporation de thymidine tritiée (en cpm) et par comptage microscopique des parasites (nb. T.V). (B) Profil type en gel d'agarose 1%, de l'ADN extrait de *T. vaginalis* à 6, 10, 20, et 24 heures de culture. M: marqueur de poids moléculaire (ØX174 /HindIII).

D. Discussion et conclusion

Dans notre volonté de mise au point d'une sonde universelle, nous avons pensé qu'il était plus approprié de prendre les souches de références C1 et RU 382 de l'American Type Culture Collection (ATCC). Ces souches, bien référencées et dont on connaît les conditions de culture, permettent de mieux élaborer les conditions de travail.

La cinétique de culture atteint très rapidement son maximum, par rapport à ce qui est habituellement décrit (Cox & Nicol., 1973). Ceci est probablement lié au matériel utilisé (incubateur régulé en température et en taux de gaz carbonique), au milieu de culture ainsi qu'à l'état des isolats inoculés. L'utilisation de sérum de cheval (10%) est aussi un facteur favorisant de cette croissance rapide.

Nous avons remarqué par la suite, comme Cox et Nicol (1973), que la variabilité des souches de *T. vaginalis* empêche d'avoir une courbe de croissance identique d'un isolat à l'autre. Les différences dans la cinétique sont observées pour ce qui concerne le début de la prolifération, mais également au niveau du pic et de la diminution de la croissance. Il est important de signaler que lorsqu'on atteint le pic maximal de prolifération, les cultures majoritairement vivantes commencent à se décoller du fond de la boîte. On sait que *T. vaginalis* est très riche en protéases. Dans les conditions de prolifération *in vitro*, il est probable que *T. vaginalis* sécrète des protéases qui, par la suite, solubilisent les parasites adhérents. D'autre part, Garber et coll., (1989) ont été les premiers à parler de l'existence d'un facteur qui détache les cellules ("cell detaching factor"). Ce facteur, qui a une activité "protein-like", pourrait être responsable de la solubilisation des parasites (Roussel et coll., 1991). Enfin, le rôle de l'équilibre naturel entre le nutriment présent et la taille du parasite est très important. Ces éléments, intervenant probablement dans la pathogénicité de *T. vaginalis*, ont une importance variable selon les isolats.

La cinétique de culture diffère selon la méthode de comptage. Alors qu'en comptage par radioactivité, le maximum d'incorporation est atteint au bout de 16 heures, il se situe autour de 23 heures par comptage au microscope.

Ceci est normal dans la mesure où il y a toujours un temps de décalage entre la réplication de l'ADN, au cours de laquelle il y a incorporation des nucléotides et en particulier de la thymidine tritiée, et la division cellulaire à proprement parlé.

Au cours des 3-4 premières heures, nous pouvons même observer une diminution du nombre de parasites par comptage au microscope. Dans les premières heures de culture, les parasites adhèrent au fond de la boîte, grâce à certaines protéines appelées adhésines. Ces protéines ont été très étudiées, en particulier dans les mécanismes de cytoadhérence et de pathogenèse de *T. vaginalis* (Alderete et coll., 1995). La cytoadhérence est l'un des processus essentiels dans la colonisation et la persistance de la pathologie, ainsi que dans les interactions entre parasites et cellules hôtes. Cette colonisation progressive s'observe bien lorsqu'on fait une culture en boîte à fond plat.

Ce parasite, qui est l'agent d'une des maladies sexuellement transmissibles les plus répandues dans le monde, colonise les cellules épithéliales vaginales qui sont probablement des portes d'entrée importantes pour le VIH au cours de la transmission sexuelle. Ce point est très important à l'ère du SIDA et nous amène à penser qu'il est crucial de connaître le rôle des antigènes sécrétés et de surface de ce protozoaire sur la transmission sexuelle du VIH.

I.2. Sélection de l'ADN cible et préparation des amorces pour la PCR

A. Introduction

Afin de pouvoir définir une bonne méthode de diagnostic par les nouvelles méthodes génomiques (PCR), nous avons utilisé trois critères pour le choix de la séquence nucléotidiques cibles:

(i) la séquence d'ADN cible doit être une séquence répétée, pour garantir la sensibilité de la détection,

- (ii) la séquence d'ADN cible doit se situer dans des régions conservées du génome, afin de pouvoir détecter tous les variants possibles,
- (iii) la séquence d'ADN cible doit être spécifique de l'espèce *T. vaginalis*, afin d'éviter les faux-positifs.

B. Matériel et méthodes

1. Souches et origine des prélèvements

Les souches de *T. vaginalis* utilisées pour cette étude proviennent du Laboratoire de Parasitologie, Centre Hospitalier Universitaire, Rouen, (France) et de l'American Type Culture Collection (ATCC, USA). Les prélèvements cervico-vaginaux viennent de l'Hôpital des armées HIA, Begin, (France) ainsi que de l'Institut Pasteur, d'Abidjan, (Côte d'Ivoire). La culture du parasite est pratiquée selon les conditions que nous avons définies dans le paragraphe I.1.

2. Recherche de séquences répétées dans l'ADN de *Trichomonas vaginalis*

Après culture, les cellules sont récoltées par centrifugation. L'ADN est extrait à froid par une méthode au DEPC et phénol-chloroforme. Ce protocole est adapté de la technique décrite par Riley et coll., (1992a).

L'ADN est digéré par l'enzyme de restriction HindIII. La migration sur gel d'agarose du produit de digestion a révélé plusieurs bandes discrètes, dont la différence de taille est un multiple d'environ 100 paires de bases. Nous avons sélectionné la bande la plus intense, dont la taille est de 2 kilobases.

3. Clonage et séquençage d'un fragment répété

Ce fragment répété a été purifié et inséré dans le vecteur M13BM21 dans un site HindIII.

Le séquençage de l'extrémité du fragment a été réalisé avec le kit Taq Dye primer (Perkin-Elmer) en utilisant une amorce M13 fluorescente. La séquence obtenue a permis de déterminer une autre amorce, utilisée pour continuer le séquençage du fragment avec le kit Taq DyeDideoxy terminators (Perkin-Elmer), et ainsi de suite.

4. Choix des amorces pour la PCR

Nous avons utilisé une partie de 900 paires de bases, très conservée dans un grand nombre de clones. Un premier couple d'amorces (TVK3 et TVK4), dont on attendait un produit de PCR de 350 paires de bases, a été choisi, synthétisé et purifié. Contrairement à ce que nous attendions, deux fragments PCR de 350 et de 450 paires de bases ont été obtenus.

Un autre couple d'amorce (TVK3/TVK7) a été choisi. Nous avons alors obtenu un fragment unique.

C. Résultats de la PCR

1. Détection de *Trichomonas vaginalis*

Ces amorces ont été utilisées avec succès dans la détection de *T. vaginalis* à partir de 300 prélèvements cervico-vaginaux recueillis par écouvillonnage. La PCR permet de détecter 50% de cas en plus par rapport aux méthodes existantes (culture et antigénémie).

Nous avons vérifié la spécificité de détection en réalisant la PCR sur des isolats de nombreux agents infectieux, dont d'autres agents de MST inflammatoires.

2. Identification d'un microsatellite

Le premier couple d'amorces (TVK3 et TVK4) choisi initialement donne deux fragments de 350 et 450 paires de bases après amplification.

Les profils de PCR obtenus avec ce couple d'amorces sont variables selon les isolats. Selon les cas, l'une ou l'autre des bandes, ou les 2 bandes, sont observées.

Le séquençage de ces 2 fragments a démontré l'existence d'une insertion récente d'environ 100 paires de bases dans le fragment de 450 paires de bases. Cette insertion contient un trinuécléotide (TGG) répété environ 13 fois.

Les amorces TVK3/TVK7 excluent cette insertion et donnent un fragment unique de 350 paires de bases.

Ces résultats (paragraphe II.2.) ont fait l'objet de la publication (n°1) qui suit.

La séquence nucléotidique de *Trichomonas vaginalis* a été déposée dans Genbank sous le numéro d'accession L23861.

TRICHOMONAS VAGINALIS: REPEATED DNA TARGET FOR HIGHLY SENSITIVE AND SPECIFIC POLYMERASE CHAIN REACTION DIAGNOSIS

Pierre KENGNE[✉], Francisco VEAS, Nicole VIDAL, Jean-Loup REY
and Gérard CUNY

Laboratoire Rétrovirus-Parasites, Institut Français de Recherche Scientifique
pour le Développement en Coopération (ORSTOM),
911 avenue Agropolis, B.P. 5045, 34032 Montpellier Cedex 1, France

Accepted May 19, 1994

Abstract - Trichomoniasis is recognised as a major sexually transmitted disease (STD) in the world and may act as an acquired immunodeficiency syndromes (AIDS) co-factor by enhancing the transmission of human immunodeficiency virus (HIV). Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* can be achieved by several methods, but sensitive detection means are still lacking. In this study a 2000-bp repeated DNA fragment of *T. vaginalis* was cloned. Part of a conserved region of this insert was sequenced, two primers (TVK3 and TVK4) were chosen and a highly sensitive detection by polymerase chain reaction (PCR) was then developed for *T. vaginalis*. All strains of *T. vaginalis* analysed with these primers gave the expected 350-bp fragment and a 450-bp additional fragment. Sequence analysis of these PCR amplification products revealed that the 450-bp fragment contained the 350-bp with a 100-bp insertion characterised by a TGG microsatellite. A second primer set, namely TVK3 and TVK7 (determined at the border of the insertion), yielded PCR products of expected sizes. After amplification we were able to detect a single parasite. We also detected *T. vaginalis* in vaginal fluids of patients with STD. There was no reaction with human DNA or other infectious agents. It appears that the two set primers are highly specific of *T. vaginalis* and provide a useful tool for PCR diagnosis in asymptomatic and symptomatic patients especially among the HIV at risk individuals.

Key words: *Trichomonas vaginalis*, AIDS co-factor, diagnosis, PCR, repeated DNA sequence, microsatellite

INTRODUCTION

The protozoan parasite, *Trichomonas vaginalis*, is a common cause of the infection of the female urogenital tract and trichomoniasis is recognised as a major sexually transmitted disease (Honigberg *et al.*, 1977; Krieger *et al.*, 1981). This parasite is the main cause of vaginitis, cervicitis and urethritis in

women and may be responsible for prostatitis and perhaps other undetermined genito-urinary syndromes in men (Honigberg *et al.*, 1989). The total amount of women affected globally per year by this parasite is estimated at around 180 millions (Honigberg *et al.*, 1989; Krieger *et al.*, 1981; Spence *et al.*, 1980). Bearing in mind the role that *T. vaginalis* can play as an acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) co-factor, it has become very important to detect *T. vaginalis* at a very early parasite infection stage and to administer a prophylactic anti-*T. vaginalis* treatment to block the

Note: Nucleotide sequence data reported in this paper have been submitted to the GenBank™ data base with accession number L23861.

possible co-factor role of the parasite (Laga *et al.*, 1990, 1993). Common clinical diagnosis of *T. vaginalis* usually needs microscopic observation of the parasite on wet mount preparations (Fouts *et al.*, 1980; Honigberg *et al.*, 1989) which is a more rapid method for diagnosis but frequently fails to detect all culture positive cases in women (Fleury *et al.*, 1979; Riley *et al.*, 1991; Wolner-Hansen *et al.*, 1989). A major limitation in serological detection of *T. vaginalis* as indirect immunofluorescence (IIF) is also their lack of sensitivity and/or, specificity (Krieger *et al.*, 1985, 1988). The cultivation of *T. vaginalis* remains the most reliable diagnostic method (Cox and Nicol, 1973; Philip *et al.*, 1987) but this technique may miss, (i) parasites present in low numbers and (ii) defective micro-organisms.

Although recent advances in DNA techniques have provided a new approach to the diagnosis of parasites by the use of species specific nucleic acid probes, the method still lacks reliable sensitivity (Pacès *et al.*, 1992; Rubino *et al.*, 1991). The advent of polymerase chain reaction (PCR) which permits the *in vitro* amplification of DNA fragments (Mullis and Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988, 1989) and increases the level of detection has opened new possibilities for the diagnosis of numerous infectious agents (Hance *et al.*, 1989; Jensen *et al.*, 1991; Kimura *et al.*, 1990; Laure *et al.*, 1990; Ostergaard *et al.*, 1990) including parasites (De Bruijn and Barker, 1992; Riley *et al.*, 1992; Veas *et al.*, 1991). Compared with culture techniques the PCR method offers advantages of sensitivity, specificity and rapidity of diagnosis.

In previous studies, Riley *et al.* (1992) underlined the difficulties of performing an accurate diagnosis of *T. vaginalis* in vaginal swabs from asymptomatic patients. In order to overcome this problem, we decided to develop a highly sensitive PCR method based on the detection of a repeated DNA target. This paper describes the characterisation of the repeated, dispersed DNA sequence and the use of specific *T. vaginalis* primers to make reliable and specific detection in a clinical sample, with low parasite loads using our PCR method.

MATERIALS AND METHODS

Organisms

The geographic origin, year of isolation and pathological characteristics of 8 cultured *T. vaginalis* strains (Hôpital Charles Nicolle, HCN, Rouen, France; American type culture collection, ATCC, USA) and 12 clinical specimens (Hôpital d'Instruction des Armées, HIA, Begin, France; Institut Pasteur, IP, Côte d'Ivoire) are listed in table 1. Clinical specimens were collected in TE50 (Tris 10 mM and EDTA 50 mM) from symptomatic and asymptomatic trichomoniasis patients. A microscopic examination was carried out. The following organisms were used as negative controls of PCR: *Candida albicans*; *Chlamidia trachomatis*; *Entamoeba histolytica*; *Enterococcus faecalis*; *Gardenerella vaginalis*; *Giardia lamblia*; *Klebsiella pneumoniae*; *Lactobacillus sp*; *Leishmania braziliensis*; *Leishmania infantum*; *Neisseria gonorrhoea*; *Pentatrichomonas hominis*; *Staphylococcus aureus*; *Trypanosoma cruzi*. from the HIA and from ORSTOM-Montpellier (France).

Parasite Cultivation

T. vaginalis were grown at 37°C with 5% CO₂ in Trypticase-Yeast extract-Maltose (TYM) medium, pH 6.2 (Diamond *et al.*, 1957) supplemented with 10% heat inactivated horse serum, penicillin G (100 IU/ml) and Streptomycin (100 mg/ml). *T. vaginalis* strains were maintained by a daily passage in a TYM medium.

DNA Purification

DNA of 10⁷ *T. vaginalis* was extracted by the modified diethyl pyrocarbonate (DEPC)-Triton X-100 method (Riley *et al.*, 1992). All experiments were done at 4°C. Mid-log parasite cultures were harvested by centrifugation (900xg during 5 min. at 5°C). The pellet was washed twice in 2 ml of cold phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, at 4°C, subsequently resuspended in 40 µl of diethyl pyrocarbonate (DEPC, Sigma), and sedimented on ice for 5 min. 20 ml of freshly prepared lysis buffer (10 mM Tris, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 7.4, and 1% vol/vol Triton X-100, Sigma) was added. This suspension was vortexed and centrifuged at 900 g during 3 min. at 4°C. The pellet was resuspended in 0.5 ml of EDTA, 0.5 mM with SDS 0.1% and treated with 200 µg/ml of proteinase K. Phenol extraction and ethanol precipitation were carried out as described by Maniatis *et al.* (1982). The vacuum dried material was resuspended in 0.5 ml of Tris HCl 5 mM, pH 8.0, and RNase (10 µg/ml) treated.

DNA Cloning

T. vaginalis DNA from the C-1: NIH (1965) ATCC strain was digested by the Hind III restriction enzyme. The digested DNA was electrophoresed in low melting agarose and a 2-kb fragment was purified from gel (Genclean, Bio 101, USA). DNA fragments were then ligated into the Hind III dephosphorylated site of M13 BM21 (Boehringer Mannheim, Germany). The recombinant phages were used to transform the *Escherichia coli* TG1 strain. Single-stranded templates were prepared from colourless clones (Maniatis *et al.*, 1982; Messing, 1983).

Table 1 Origin, cytopathic effect, clinical signs of: (A) cultured and (B) clinical specimens of *T. vaginalis* strains

A				
Cultured strains	Origin	Year of isolation	Cytopathic effect	
TO	HCN, Rouen	1982	NCP	
DD	HCN, Rouen	1982	NCP	
RO	HCN, Rouen	1982	CP	
DRA	HCN, Rouen	1982	CP	
LPZ	HCN, Rouen	1982	NCP	
GB	HCN, Rouen	1981	CP	
C-1: NIH	ATCC, USA	1965	ND	
RU 382	ATCC, USA	1985	ND	
B				
Clinical specimens	Geographic origin	Year of isolation	Microscopic diagnosis	Clinical signs
X2	HIA, St.-Mandé	1993	++	CST
PHI	HIA, St.-Mandé	1993	++	CST
HER	HIA, St.-Mandé	1992	+	CST
OUA	IP, Côte d'Ivoire	1993	+++	CST
AGN	IP, Côte d'Ivoire	1993	+++	CST
MAN	IP, Côte d'Ivoire	1993	+	CST
BOT	IP, Côte d'Ivoire	1993	+	CST
LZG	IP, Côte d'Ivoire	1993	+/-	CST
OUM	IP, Côte d'Ivoire	1993	-	CST
KOA	IP, Côte d'Ivoire	1993	-	CST
KOE	IP, Côte d'Ivoire	1993	-	CST
PRE	IP, Côte d'Ivoire	1993	-	NCST

- NCP : No cytopathic effect on Mc Coy cells
- CP : Cytopathic effect on Mc Coy cells
- ND : None determined cytopathic effect
- CST : Clinical signs of trichomoniasis
- NCST : No clinical signs of trichomoniasis

DNA Sequencing

All DNA sequencing were performed by using the dideoxy chain termination method (Sanger *et al.*, 1977) with Taq Dye primer or a Taq Dye terminator sequencing kit, specifically developed for sequencing on the Applied Biosystem Model 373A (USA). Sequencing reactions were primed first with M13 primers and subsequently with synthetic oligonucleotides which permitted «gene walking» on the 2-kb DNA fragment. Sequences were established for both strands and analysed using Macintosh SeqEd DNA Software (March, 1988).

Synthetic Oligonucleotides

The three primers: TVK3, TVK4, TVK7 used in this study have been chosen within a 912-bp fragment from the repeated 2-kb sequence.

TVK3: 5'ATTGTCGAACATTGGTCTTACCCTC3'
 TVK4: 5'CTCGACCTATCCGATTCAAAGACTCC3'
 TVK7: 5'TCTGTGCCGTCTTCAAGTATGC3'.

These primers were synthesised on an Applied Biosystems 391 DNA Synthesiser (USA) and purified by Purification Cartridge (O.P.C.) column (Applied Biosystems, USA).

PCR Amplification

Infectious organisms and clinical samples were resuspended in 12.5 µl of solution A (100 mM KCl, 10 mM Tris, pH 9.0, 1.5 mM MgCl₂) and 12.5 µl of solution B (10 mM Tris, pH 9.0, 1.5 mM MgCl₂, 0.2% Triton X-100) to which 200 µg/ml of proteinase K were added just before use. After heating at 60°C during 60 min., followed by 10 min. proteinase K inactivation at 95°C (Innis and Gelfand, 1990; Kawasaki,

1990), PCR were performed either on 1 µg of extracted DNA or directly on 25 µl of the lysate samples in a thermal cycler, PHC2 (Techne, UK). The final reaction mixture (50 ml) contained: 20 picomoles of each primer; 200 µM each dATP, dTTP, dCTP, dGTP; 1.5 mM MgCl₂; 1 x Taq buffer (Promega, US) and 2 Units of *Thermus aquaticus* polymerase (Promega) overlaid with one drop of mineral oil. Samples were subjected to 20-45 cycles of amplification. PCR consisted of a denaturation step at 90°C for 1 min., annealing at 60°C for 30 sec. and elongation at 70°C for 2 min. The PCR products were separated by electrophoresis in 1.5% agarose gel containing 0.5 µg/ml ethidium bromide and photographed under UV light.

Southern Blotting

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) from TO, DD, RO, C-1:NIH (from ATCC, USA) strains and PCR product were resolved on agarose gels. After alkaline treatment of the gel with 0,5 N NaOH and 1,5 M NaCl, DNAs were transferred onto charged nylon membrane, Hybond N+ (Amersham, UK), using a vacuum blotting apparatus (Millipore, USA) or by pocket-blotting technique (Cuny *et al.*, 1991).

DNA Probe Labeling and Hybridization

A 350-bp fragment was generated by PCR amplification of the ATCC strain C-1: NIH with primers TVK3 and TVK4. Amplified DNA was separated in low melting 1,5% agarose gel (Genetic Technology Grade USA). This DNA fragment was subsequently eluted using Genclean kit (BIO 101, USA) and stored at -20°C until use.

Twenty five nanograms of the 350-bp probe fragment were labelled with [α -³²P]dCTP using the megaprime random-labeling system (Amersham, UK). After 30 min. pre-hybridization of membranes in the rapid hybridization buffer (Amersham, UK) at 65°C, the denatured probe was added and hybridization carried out for 3 hrs. at the same temperature. Membranes were then washed twice with 2 x SSPE (20 x SSPE: 3,6 M NaCl; 0,2 M NaH₂PO₄; 0,002 M EDTA), 0,1% SDS at 65°C for 15 min. and once at high stringency in 0,2 x SSPE, 0,1% SDS at 65°C for 15 min. Membranes were briefly air dried and exposed to autoradiographic films (Hyperfilm MP, Amersham, UK) for 18 hrs. at -80°C.

RESULTS

Repeated DNA Sequence as a Target for T. vaginalis Primers: Sequence and Structure

Purified *T. vaginalis* DNA was Hind III restricted and electrophoresed in an agarose gel. This electrophoresis reveals bands over a smear indicating the presence of repeated fragments in *T. vaginalis* DNA. The most intense band (2-kb) was extracted from the agarose gel and cloned in M13 BM21. Five

clones from 2-kb repeated fragments were partially sequenced and comparisons among them exhibited divergence rates of about 5-10%. Changes generally occur in nucleotide substitution or in single base deletion. A consensus sequence was established for 912-bp (Fig. 1). This sequence reveals a high frequency of Taq I sites. We have chosen two oligonucleotides flanking a 350-bp Taq I fragment TVK3 and TVK4 (positions are underlined in Fig. 1A). These primers were used on the C-1: NIH ATCC strain to test PCR amplification, two bands were amplified from this DNA: one with the expected size (350-bp) and an another band at 450-bp. To identify these two DNA fragments, PCR direct sequencing was performed. These sequences revealed that the 350-bp fragment corresponded to the expected DNA size and that the 450-bp fragment contained the 350-bp with a 100-bp insertion at position 240-bp flanked by short duplication ATTTTAA. The presence of a TGG microsatellite in this insertion is shown in fig. 1B.

DNAs from TO, DD, RO, C-1: NIH strains were digested with Hind III. As shown in fig. 2, several bands already seen with the C-1: NIH strain were present at the same position in the three other *T. vaginalis* strains (see Fig. 2A) and the 2-Kb band was always present. DNAs were transferred and hybridized with the 350-bp fragment. This probe detected only a few bands and the 2-Kb fragment only in two strains (Fig. 2B). These results indicate that the 350-bp fragment does not belong to a "satellite type" sequence since a classical pattern with multimeric bands is not observed after hybridization. This fragment is more probably part of a family of dispersed repeated sequences, where Hind III sites are not well conserved within the different strains.

Detection of T. vaginalis

– *Using cultured parasites.* In order to investigate the use of PCR tests in clinical samples, parasites of cultured *T. vaginalis* were directly subjected to PCR (see Material and Methods section). 10⁵ parasites of each strain were used as the source of target DNA in the PCR. Oligonucleotides TVK3

A

CACACCCCAA	ACTTGCAATG	ACACTCAAAT	TGCTTATGAA	TTCGACATGG	GATATTCCAT	60
TAAGAAACCT	CAAGAGATGA	CAAGAGTAAA	TTATGAGAAG	GTCGACAAC	TTGTTGAAAG	120
GTTTTCTCCT	TTTGTTTTGA	AGTACGAATT	CACTCAAGGT	CAAAGTGGCT	TAGTAACCAC	180
ATTAAAACCT	<u>ATTGTCGAAC</u>	<u>ATTGGTCTTA</u>	<u>CCCTCAGTTC</u>	GCAAAGGCAG	TCCTTGACAA	240
CTACAACAAA	TTCTTCTCCG	AAGTCAAATC	CAAAGTGAAG	GTTTACTATG	AGAACATTGA	300
CGCACTCATG	ACGAACGAAG	AAGGGTACAA	CAAAC TCATT	GAAATGGGAA	TGGTCGCTGA	360
AAAGATGGGT	GTTTTAAGCT	AGATAAGGTA	TTTTCCGAAG	TTCATGTCCT	CTCCAAGCGT	420
AAGTACTGGG	<u>GCATACTTGA</u>	<u>AGACGGCACA</u>	<u>GAAATAAAAC</u>	ATTGCATGAA	ATAAAAAATT	480
TTTATATTCC	TTCCTAGCTA	ATTTCCGTTT	AATTT CATGG	TCGCCCTCGG	<u>AGTCTTTGAA</u>	540
<u>TCGGATAGGT</u>	<u>CGAGTTACAC</u>	CATTCTTGGT	CTCAAAC TC A	TATATAACCT	GTTTGTCTGT	600
ATTTTCGTCG	ACTATGGCAC	GAGACACAAA	CATTGACCAC	ACGGACAAAA	AGTGTCATTT	660
CGGATGGTCA	AGCAGCCAAT	CGCATTTCGAG	CACTTCGAAG	AAGCCTTTAC	GTTCCAAGGG	720
AGAGGGTGTC	TGGTGCAAGG	CAGAGGTCAT	GCCACTCTAC	GAGCAGTACA	GTTCCCCTGG	780
GAGAACATTT	CGTCCTTGG A	TTGGCAATAC	TACCAACTCC	TCTGGGACGA	CCTCCTACGC	840
AACTGGGTTA	ACGATTGTGT	CCACTTCAAA	GGTCGGGAAC	TAATTTGGAA	AATTACCCTT	900
AATTTCCCAT	CC					960

B

<u>ATTTT TAG T</u>	TCTGAATTTG	AATGTGGTAT	GGGTAGGCTT	GGGAAGGGAA	<u>TAGGCATGGT</u>	60
<u>GGAGGAGGAG</u>	<u>GTACAGGTGG</u>	<u>TGGTGGTGGT</u>	<u>GGTGGTGGCA</u>	ACAGTCCATT	<u>TTTA</u>	120

Fig. 1 Sequence analysis of the *T. vaginalis* PCR target fragment. Consensus sequence (A) 912-bp from 2-Kb repeated fragment of C-1: NIH (1965) *T. vaginalis* strain, the arrow shows positions of primers TVK3, TVK4, TVK7 and an insertion site (a) of a 100-bp sequence (B) containing TGG microsatellite (underlined) flanked by a duplicated small fragment ATTTT A. This inserted sequence was obtained from 450-bp consensus sequences from several *T. vaginalis* DNAs.

and TVK4 were used as primers. For five strains RO, C1, LPZ, DR and DD, the 450-bp and 350-bp were present with differences in intensities. For two others strains TO and GB, only the 450-bp fragment was present with a weak intensity (Fig. 3A). This result indicates that our primers can be used with a

high rate of efficiency directly on parasites from different strains. However, since the 450-bp fragment is due to a 100-bp insertion which would not be the general rule for all *T. vaginalis* strains, we have determined the sequence of another oligonucleotide, TVK7, at the 5' border of the insertion (see Fig. 1A).

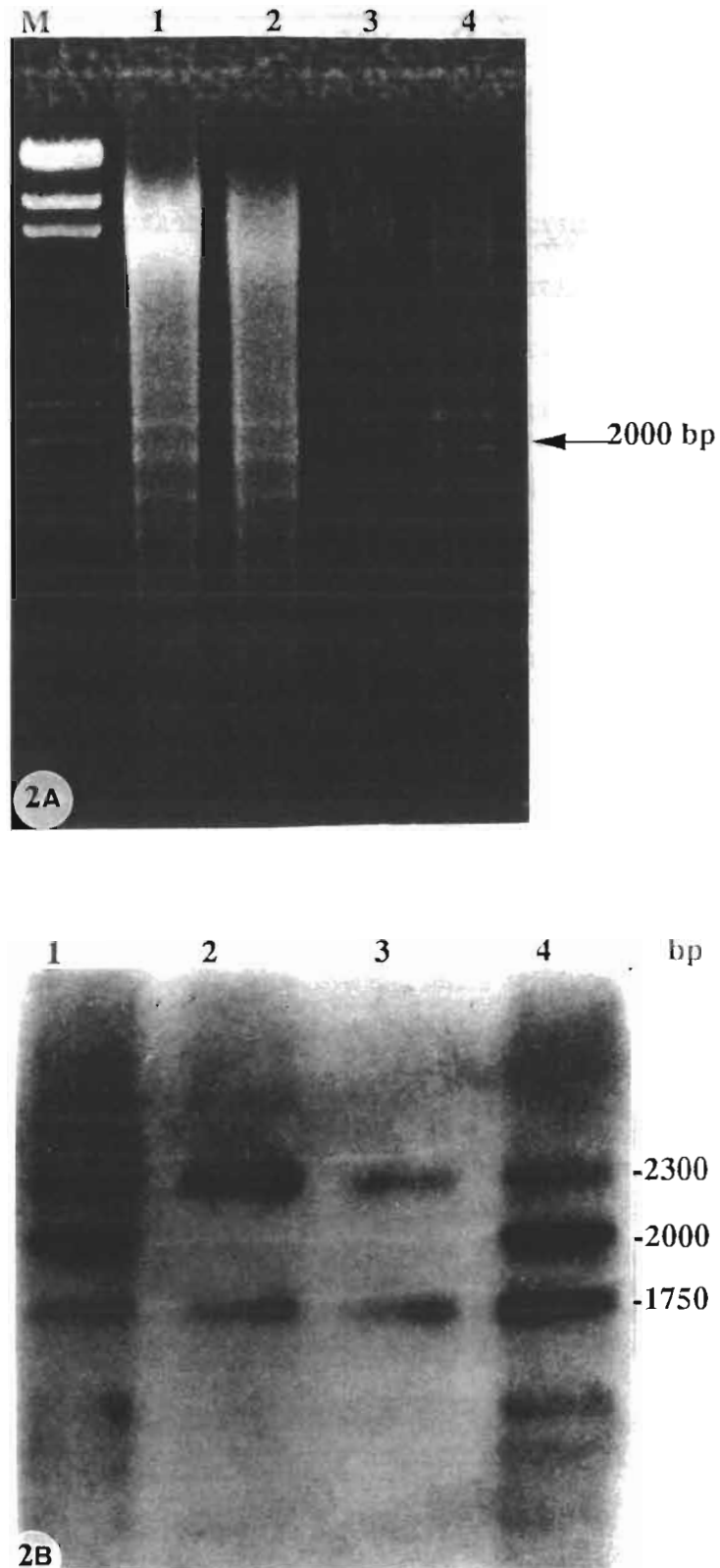


Fig. 2 Banding pattern of *HindIII* digested DNA. A) UV photograph of *HindIII* digestion of 10 micrograms of different *T. vaginalis* DNAs resolved on 1% agarose gel and B) southern blot analysis using the 350-bp fragment probe. Lanes: M, λ digested by *PstI*; 1 to 4 correspond to TO, RO, DD and C-1: NIH ATCC strains.

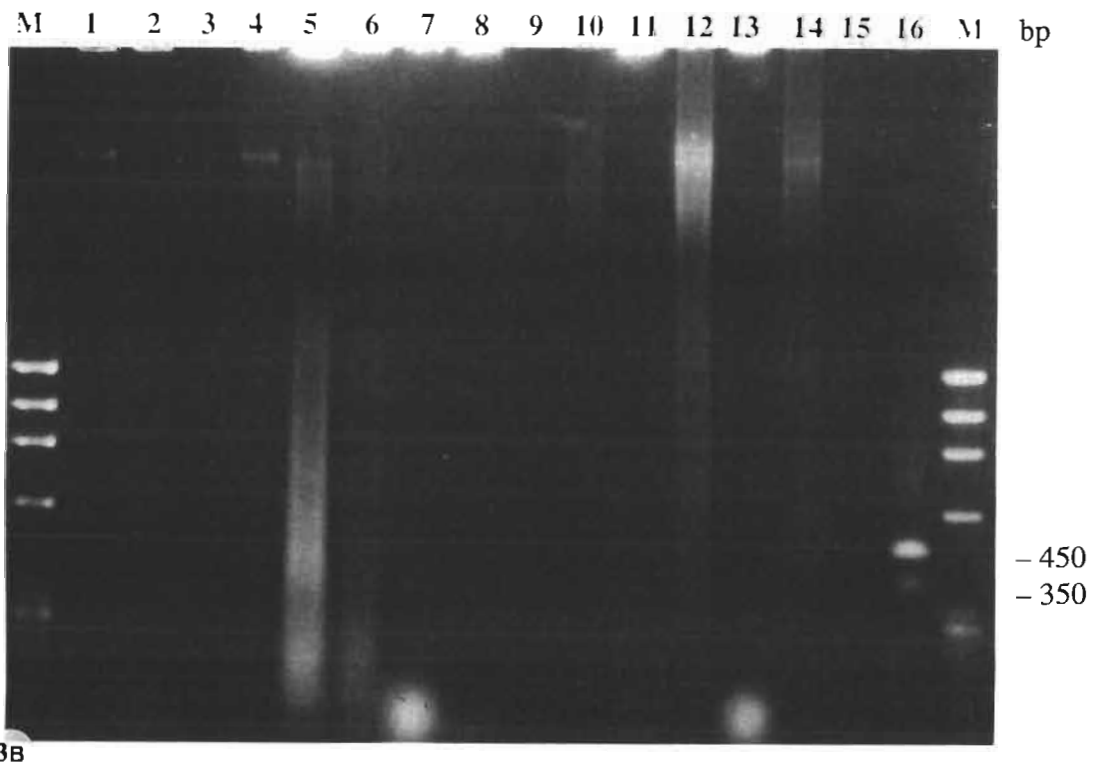
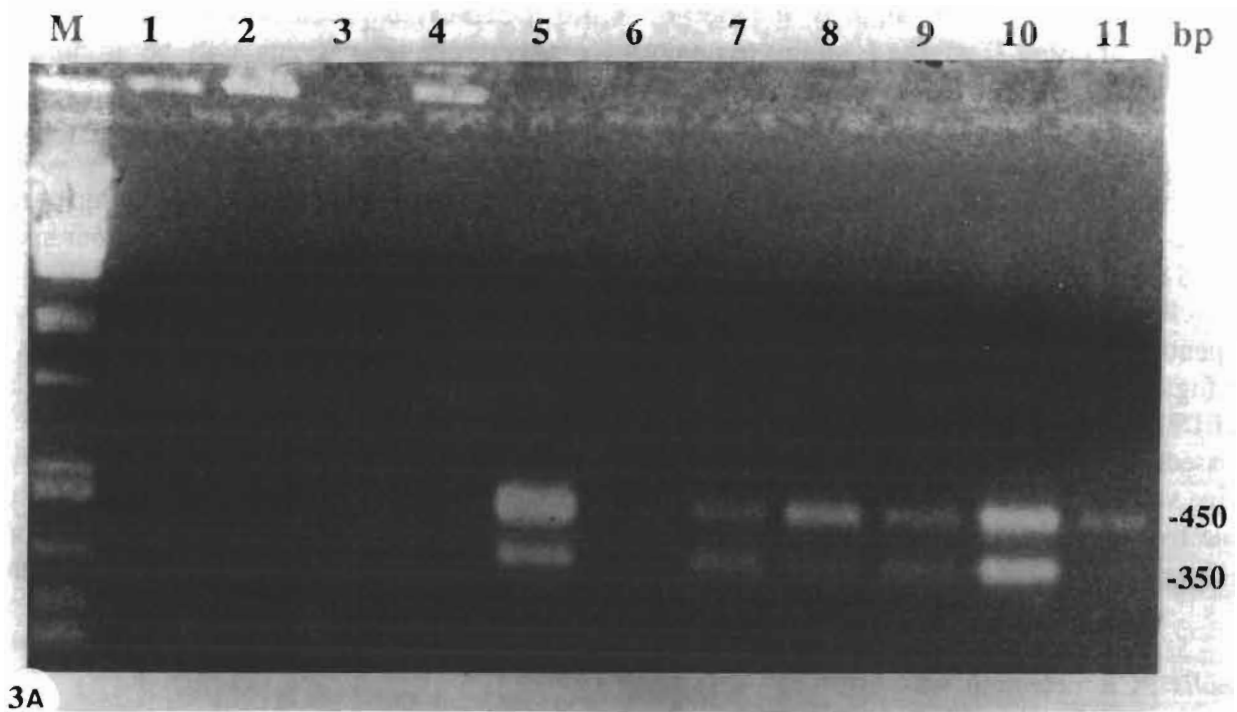


Fig. 3 Direct and specific detection of *T. vaginalis* parasites by PCR amplification. 1% agarose gel electrophoresis of DNA amplified products from different *T. vaginalis* cultured strains using: **A)** the couple TVK3/TVK4. (Lanes 1: human DNA; 2: human PBMC; 3: milli-Q water; 4: Mc Coy cells; 5: C-1: NIH (1965); 6: TO; 7: RU 382 (1985); 8: LPZ; 9: RO; 10: DRA; 11: DD *T. vaginalis* strains and M: λ PstI). **B)** control experiments using the couple TVK3/TVK4. Lanes 1: *C. albicans*; 2: *C. trachomatis*; 3: *E. histolytica*; 4: *E. faecalis*; 5: *G. vaginalis*; 6: *G. lamblia*; 7: *K. pneumoniae*; 8: *Lactobacillus* sp; 9: *L. braziliensis*; 10: *L. infantum*; 11: *N. gonorrhoea*; 12: *P. hominis*; 13: *S. aureus*; 14: *T. cruzi*; 15: milli-Q water; 16: *T. vaginalis* strain and M: λ .PstI.

TVK3 and TVK7 primers amplify the 300-bp fragment in all tested *T. vaginalis* strains (data not show). All controls were PCR negative (Fig. 3B).

– *Using clinical specimens.* Vaginal swabs were collected in the TE50 buffer (Tris 10 mM, EDTA 50 mM) from different patients: i) patients at risk for STD or ii) HIV infected patients exhibiting, or not, clinical signs and iii) patients following a therapeutic treatment for trichomoniasis. After centrifugation and several washes with TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0), pellets swabs were PCR processed as described above. All samples were positive when using the two primers sets, even a sample from nitroimidazole-treated patient (Figs. 4A, 4B).

– *Sensitivity of the PCR.* The sensitivity of *T. vaginalis* PCR detection was assessed using the lysis procedure during a parasite serial dilution. The number of viable organisms was determined by microscopy. Five different concentrations of parasites were used: 1; 5; 10; 50 and 100 parasites in 10 µl of TE. Thirty-five PCR cycles were carried out in the conditions described in the Material and Methods section, using TVK3 and TVK4 primers. As shown in fig. 5A, saturation PCR signals were obtained after 35 cycles including the case of a single cell. Limit PCR amplification conditions were used in aiming to assess the relative loads of *T. vaginalis* from vaginal swabs and 25 PCR cycles were carried out (Fig. 5B). Amplification products were transferred onto the Hybond N+ membrane and hybridized with 350-bp probe. A gradient of hybridization response was obtained (Fig. 5C) from a very slight (one parasite) to a highly strong (100 parasites) signal.

DISCUSSION

If we consider that most STDs could play a major role as a co-factor (Laga *et al.*, 1993) in the transmission and/or in the evolution of HIV infection towards AIDS, detecting these STDs has become important in the present context of the global spread

of AIDS. Early diagnosis of this co-factor especially in asymptomatic patients will be important in prophylactic treatment to prevent the co-factor effect. We have therefore developed PCR methodology for accurate and sensitive diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. This PCR is carried out by using repetitive DNA from the parasite as targets for our specific primers TVK3, 4, 7.

Within the scope of epidemiological studies it is always necessary to preserve the DNA for delayed diagnosis. Taking into account the high levels of nucleases within this parasite, we have improved a TE50 buffer for the DNA sample collection of *T. vaginalis* and for long term transport and storage. This buffer has been tested with *T. vaginalis* samples and successfully stocked at room temperature for 2 months.

A 350-bp expected fragment, or both 350-bp and 450-bp in some cases, was produced. Sequence analysis of the 450-bp fragment reveals the presence of a recent insertion of 100-bp since a 7-bp duplication at its borders is well conserved and because of the presence in this insertion of a (TGG)₁₃ microsatellite sequence. The choice of a repetitive DNA improved the detection level of the parasite. It was then possible not only to obtain a diagnosis with a single parasite, (from the culture dilution present as we have shown in our results), but also to obtain positive results (from asymptomatic patients) from clinical samples, previously found negative with the classical tests (especially with the serological test in AIDS patients). We have in our hands a sensitive method for diagnosis in the asymptomatic phase, this method is at least 10 fold higher sensitivity than previously described techniques by Riley *et al.* (1992). The primers TVK3,4,7 allow not only highly sensitive amplification but have a very accurate specificity level. Taken into account are the different positive PCR from *T. vaginalis* strains from several geographic areas and the negative PCR from human DNA and a wide variety of infectious agents including *Pentatrichomonas hominis*, whether STDs or not. We have tested our method by operating in experimental conditions of mixed infectious agents

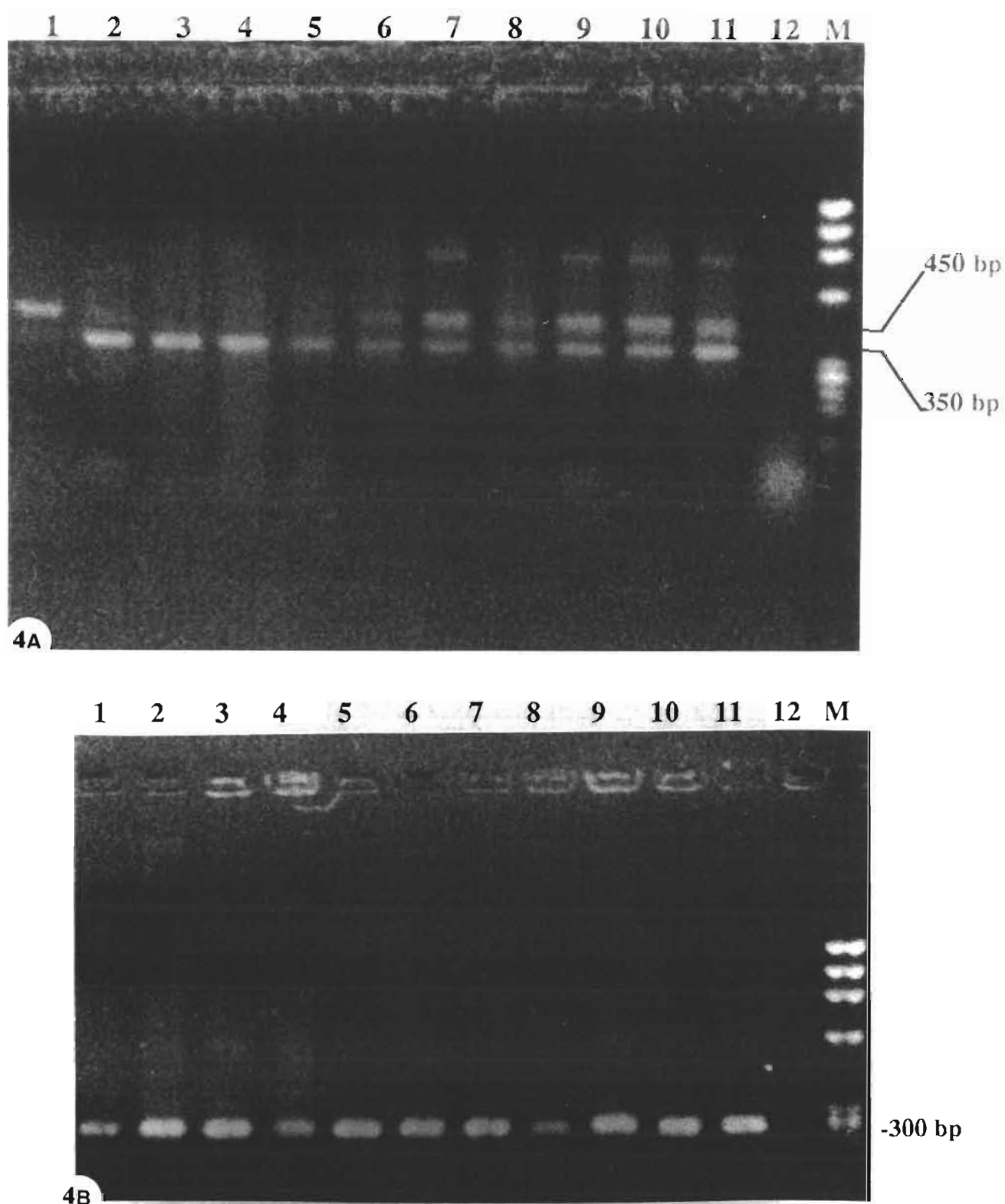
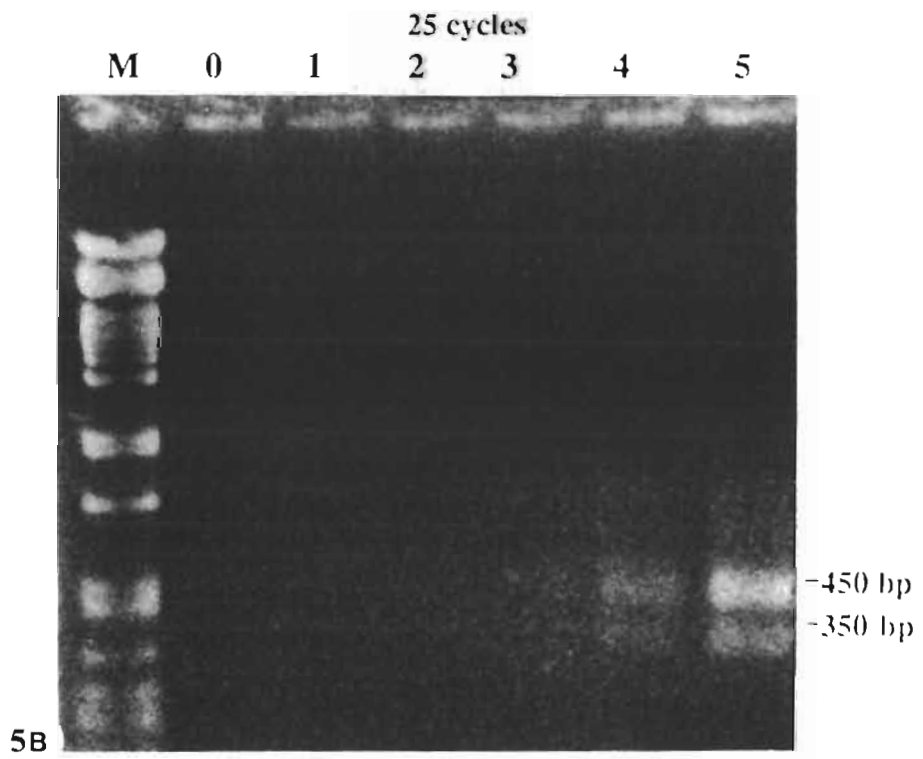
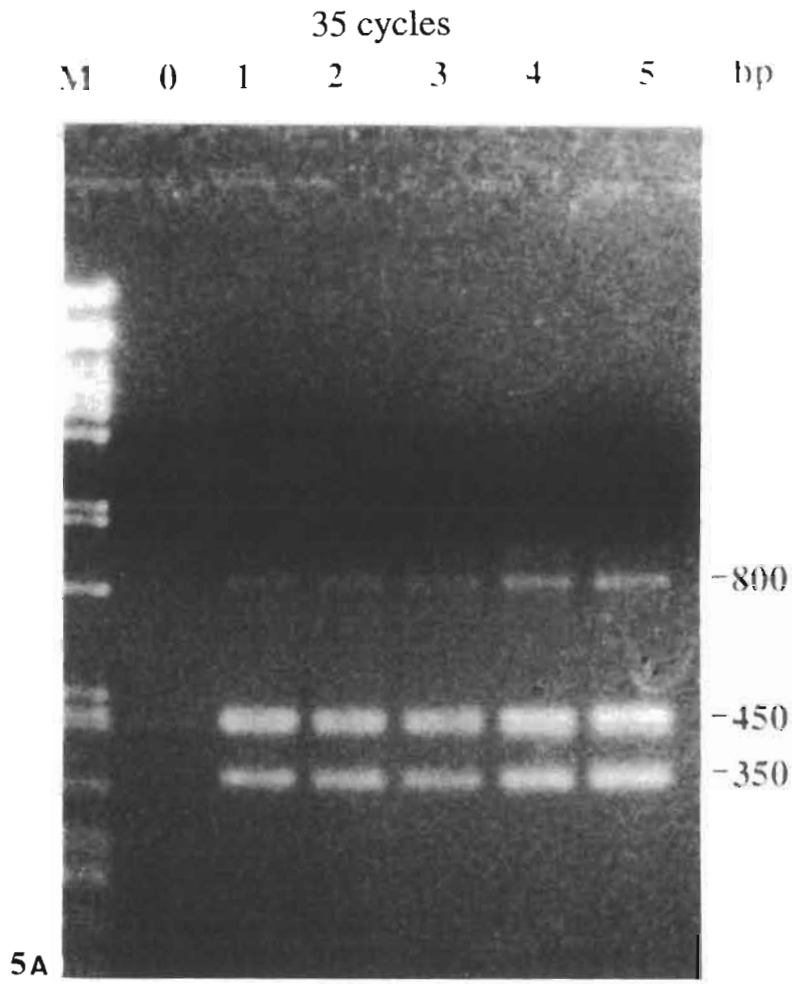


Fig. 4 Direct detection of *T. vaginalis* in clinical specimens. Agarose gel electrophoresis of amplified clinical specimens using oligonucleotide primers (A): TVK3 and TVK4 and (B): TVK3 and TVK7. Lanes 1 to 11 correspond to samples from patients with clinical signs of trichomoniasis; 12 corresponds to a vaginal swab from healthy women; M: Φ x174 Hae III.



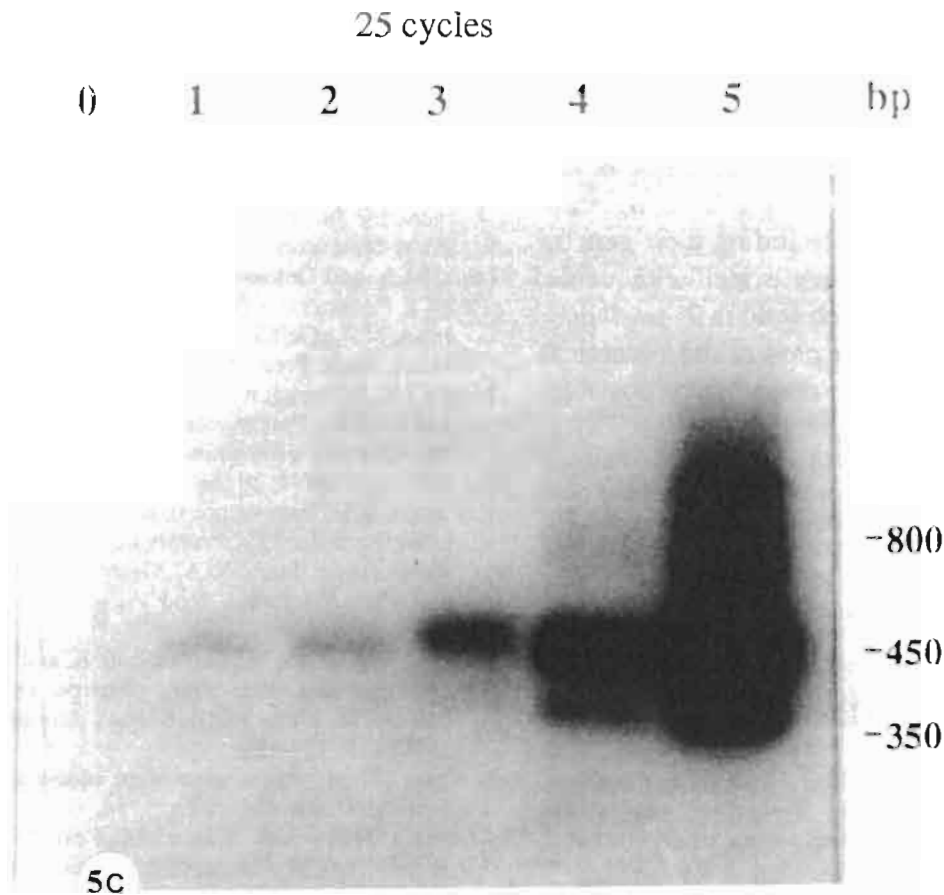


Fig. 5 The sensitivity of *T. vaginalis* detection by PCR. Agarose gel electrophoresis showing, respectively 35 (A) and 25 (B) amplification cycle products and a southern blotting of 25 amplification cycle products hybridized with $\alpha^{32}\text{PdCTP}$ 350 bp *T. vaginalis* probe (C). PCR amplification were done with a *T. vaginalis* serial dilution and subjected to PCR using TVK3 and TVK4 primers. Lane: 0, milli-Q water; lane 1 to 5 correspond to 1, 5, 10, 50 and 100 parasites and M: λ PstI.

(*T. vaginalis* with other infectious agents previously described), and we obtained positive PCR results (data not shown). These experiments performed under extreme conditions of co-infection provide evidence of the efficacy of our method. Our primer sets demonstrated a strong specificity and we can therefore conclude that we possess an accurate, direct and sensitive method of diagnosis of *T. vaginalis* in asymptomatic patients.

Another important factor is the possible correlation between the *T. vaginalis* load and the clinical signs of this infection. Studies are actually undertaken to improve the assessment of relative parasite loads from clinical specimens. Our preliminary PCR experiments with serial dilution of cultured parasites

have shown a gradient hybridization response from 1 to 100 or more. It became particularly interesting in the evaluation of the efficacy of therapeutic follow-up studies to assess these relative parasite loads. At present we have shown the lack of efficacy of treatment in at least one case among our panel PCR tests. In fact nitroimidazole therapy control that was not clearly positive by microscopic analysis was subsequently confirmed positive by PCR amplification using the two sets of primers. It should be noted here that one of the major points of this issue is the multi-resistance of the parasites to their classical drugs as in AIDS associated tuberculosis.

Of great importance is the need for a structured approach of the genetic classification of *T. vaginalis*

and it was in consideration of this that we explored the structure of our *T. vaginalis* PCR target. The finding of a microsatellite for the first time in the *T. vaginalis* genome, could be of great interest in the analysis of phenotypic variations (Alderete *et al.*, 1986, 1992; Dailey *et al.*, 1991) within *T. vaginalis* isolates, especially in understanding their genetic population structures. This microsatellite sequence opens a new genetic research field in *T. vaginalis*. Other microsatellites may be present and a genetical classification of *T. vaginalis* may soon be possible.

Acknowledgments - We would like to thank Prof. Philippe Brasseur (Rouen, France) for kindly providing strains of *T. vaginalis*, Prof. Mireille Dosso (Abijan, Côte d'Ivoire), Dr. Roland Fabre (St.-Mandes, France) for kindly providing clinical samples and Dr. Sophie Ravel and Cécile Brengues (ORSTOM, France) for helpful suggestions.

REFERENCES

- Alderete, J.F., Arroy, R., Dailey, D.C., Engbring, J., Khoshnan, M.A. and Lehker, W.M., Molecular analysis of *Trichomonas vaginalis* surface protein repertoires. *Mol. cell. Biol. Hum. Dis. Ser.* 1992, **1**: 173-202.
- Alderete, J.F., Kasmala, L., Metcalfe, E.C. and Garza, G.E., Phenotypic variation and diversity among *Trichomonas vaginalis* and correlation of phenotype with contact-dependent host cell cytotoxicity. *Infect. Immunol.* 1986, **53**: 285-293.
- Cox, P.J. and Nicol, C.S., Growth studies of various strains of *Trichomonas vaginalis* infection. *J. clin. Pathol.* 1973, **41**: 806-808.
- Cuny, G., Veas, F. and Roizès, G., "Pocket-blotting": A method for transferring nucleic acids onto nylon membranes. *Anal. Biochem.* 1991, **193**: 45-48.
- Dailey, D.C. and Alderete, J.F., The phenotypically variable surface protein of *Trichomonas vaginalis* has a single, tandemly repeated immunodominant epitope. *Infect. Immunol.* 1991, **59**: 2083-2088.
- De Bruijn, M.H.L. and Barker, D.C., Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop.* 1992, **52**: 45-58.
- Diamond, L.S., The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J. Parasitol.* 1957, **43**: 488-490.
- Fleury, F.J., Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. *JAMA* 1979, **242**: 2556-2559.
- Fouts, A.C. and Kraus, S.J., *Trichomonas vaginalis* re-evaluation of its clinical presentation and laboratory diagnosis. *J. Infect. Dis.* 1980, **141**: 137-143.
- Hance, A.J., Grandchamp, B., Levy-Frebault, V., Lecossier, D., Rauzier, J., Bocart, D. and Gicquel, B., Detection and identification of mycobacteria by amplification of Mycobacterial DNA. *Mol. Microbiol.* 1989, **3**: 843-849.
- Honigberg, B.M., In: *Trichomonads Parasitic in Humans*. Honigberg, B.M. (ed.), Springer Verlag, New York, 1989, pp. 311-324.
- Honigberg, B.M., Trichomonads of importance in human medicine. In: *Parasitic Protozoa*, Kreier, J.P. (ed.), Acad. Press, New York, 1977, pp. 275-454.
- Innis, M.A. and Gelfand, D.H., Optimization of PCRs. In: *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*, Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds.), Acad. Press, San Diego, 1990, pp. 3-12.
- Jensen, J.S., Uldum, S.A., Sondergard-Andersen, J., Vuust, J. and Lind, K., Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples. *J. clin. Microbiol.* 1991, **29**: 46-50.
- Kawasaki, E.S., Sample preparation from blood, cells, and other fluids. In: *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*, Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White T.J. (eds.), Acad. Press, San Diego, 1990, pp. 146-152.
- Kimura, H., Shibata, M., Kuzushima, K. and Nishikawa, K., Detection and direct typing of herpes simplex virus by polymerase chain reaction. *Med. Microbiol. Immunol.* 1990, **179**: 177-184.
- Krieger, J.N., Urologic aspects of trichomoniasis. *Invest. Urol.* 1981, **18**: 411-417.
- Krieger, J., Holmes, K., Spence, M., Rein, M., McCormack, W. and Tam, M., Geographic variation among isolates of *Trichomonas vaginalis*: Demonstration of antigenic heterogeneity by using monoclonal antibodies and the indirect immunofluorescence technique. *J. Infect. Dis.* 1985, **152**: 979-984.
- Krieger, J.N., Milton, R.T., Stevens, C.E., Nielsen, I.O., Hale, J., Kiviat, N.B. and Holmes, K.K., Diagnosis of Trichomoniasis: comparison of conventional wet-mount examination with cytologic studies, cultures, and monoclonal antibody staining of direct specimens. *JAMA* 1988, **259**: 1223-1227.
- Laga, M., Manoka, A., Kivuvu, M., Malele, B., Tuliza, M., Nzila, N., Goeman, J., Behets, F., Batter, V., Alary, M., Heyward, W.L., Ryder, R. W. and Piot, P., Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. *AIDS* 1993, **7**: 95-102.
- Laga, M., Nzila, N., Malele, M., Bush, T.J., Behets, F., Heyward, W.L., Piot, P. and Ryder, R., *Non ulcerative sexually transmitted Diseases (STD) as Risk Factors for HIV Infection*. Th. C.97. Sixth International Conference on AIDS, San Francisco, June 1990, Abstract, 20-24.
- Laure, F., Rouzioux, C., Veber, F., Jacomet, C., Courgnaud, V., Blanche, S., Burgard, M., Griscelli, C. and Brechot, C., Detection of HIV-1 DNA in infants and children by means of polymerase chain reaction. *Lancet* 1990, **ii**: 538-541.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J., Molecular cloning. In: *A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor

- Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982.
- March, C., "DNA Strider": a "C" program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple MacIntosh family computers. *Nucl. Acids Res.* 1988, **16**: 1829-1836.
- Messing, J., New M13 vectors for cloning. *Meth. Enzymol.* 1983, **101**: 20-27.
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A., Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 1987, **155**: 335-350.
- Ostergaard, L., Birkelund, S. and Christiansen, G., Use of polymerase chain reaction for detection of *Chlamidia trachomatis*. *J. clin. Microbiol.* 1990, **28**: 1254-1260.
- Pacès, J., Urbànková, V. and Urbànek, P., Cloning and characterization of a repetitive DNA sequence specific for *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1992, **54**: 247-256.
- Philip, A., Carter-Scott, P. and Rogers, C., An agar culture technique to quantitate *Trichomonas vaginalis* from women. *J. Infect. Dis.* 1987, **155**: 304-308.
- Riley, D.E. and Krieger, J.N., Rapid and practical DNA isolation from *Trichomonas vaginalis* and other nucleic acid rich protozoa. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1992, **51**: 161-164.
- Riley, D.E., Roberts, M.C., Takayama, T. and Krieger, J.N., Development of a Polymerase Chain-based diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. *J. clin. Microbiol.* 1992, **30**: 465-472.
- Riley, D.E., Samadpour, M. and Krieger, J.N., Detection of variable DNA repeats in diverse eucaryotic microorganisms by a single set of polymerase chain reaction primers. *J. clin. Microbiol.* 1991, **29**: 2746-2751.
- Rubino, S., Muresu, R., Rappelli, P., Fiori, P.L., Rizzu, P., Erre, G. and Cappuccinelli, P., Molecular probe for identification of *Trichomonas vaginalis* DNA. *J. clin. Microbiol.* 1991, **29**: 702-706.
- Saiki, R.K., Gelfang, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Ehrlich, H.A., Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988, **239**: 487-491.
- Saiki, R., Oster, C. and Higuchi, R., PCR Technology. In: *Principles and Applications for DNA Amplification*, Ehrlich, H.A. (ed.), Stockton Press, Hants, 1989, pp. 7-39.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. natn. Acad. Sci. USA* 1977, **74**: 5463-5467.
- Spence, M.R., Hollander, D.H., Smith, J., McCaig, L., Sewell, D. and Brockman, M., The clinical and laboratory diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. *Sex. Transm. Dis.* 1980, **7**: 168-171.
- Veas, F., Breniere, S.F., Cuny, G., Brengues, C., Solari, A. and Tibayrenc, M., General procedure to construct highly specific kDNA probes for clones of *Trypanosoma cruzi* for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Cell. mol. Biol.* 1991, **37**: 73-84.
- Wolner-Hansen, P., Krieger, J.N., Stevens, C.E., Kiviat, N.B., Koutsky, L., Critchlow, C., DeRouen, T., Hillier, S. and Holmes, K.K., Clinical manifestations of vaginal Trichomoniasis. *JAMA* 1989, **261**: 571-576.

Conclusion Chapitre I (I) **Mise au point du diagnostic direct par PCR de** ***T. vaginalis***

(i) - Préalablement à la mise au point de cette méthodologie nouvelle pour le diagnostic de *T. vaginalis*, basée sur l'amplification génétique (PCR), nous avons dû déterminer les conditions optimales de la préparation de l'ADN, compte tenu de l'activité endonucléasique importante chez ce parasite.

(ii) - Après séquençage de fragments cibles à partir desquels les amorces pour la PCR ont été choisies, nous avons mis en évidence, pour la première fois, une séquence microsatellite chez un protozoaire. L'existence de ce type de séquences permet d'envisager leur utilisation dans la recherche des itinéraires de contamination par ce parasite, mais également dans des études de génétique des populations. Ces deux possibilités n'ont pas fait l'objet de ce travail.

(iii) - Les résultats du diagnostic par PCR montrent clairement que la méthode mise au point permet d'améliorer considérablement la sensibilité du diagnostic de cette maladie. Son efficacité a été augmentée de 50% par rapport à l'observation microscopique classique. Cette méthode de diagnostic nous a aussi permis de détecter des cas d'infection asymptomatique à partir des prélèvements cervico-vaginaux d'origines géographiques diverses.

(iv) - La rapidité de cette méthode, par rapport à la mise en culture, donne un diagnostic précoce qui permet d'intervenir plus tôt chez les patients, afin de prévenir les risques de transmission sexuelle du VIH. Cet outil, qui devrait améliorer la caractérisation épidémiologique et physiopathologique des co-infections *T. vaginalis* et VIH, peut aussi être utilisé dans l'évaluation de programmes d'intervention en santé publique.

II: Mise au point et évaluation d'une technique de détection simultanée ("Line Probe Assay," (LiPA)) de *Chlamydia trachomatis* et de *Neisseria gonorrhoeae* (Publication n° 2)

A. Introduction

Chlamydia trachomatis et *Neisseria gonorrhoeae* sont deux agents pathogènes des maladies sexuellement transmissibles non ulcéraives, responsables de la plupart des syndromes génito-urinaires. Ces agents, lorsqu'ils ne sont pas traités ou lorsque des souches résistantes apparaissent, peuvent être à l'origine de lésions graves. Ils sont très répandus et souvent transmis simultanément, avec *Trichomonas vaginalis*. De plus, les infections qu'ils provoquent présentent la même symptomatologie.

Le but à terme est de mettre au point un diagnostic capable de détecter simultanément ces trois agents, et de les différencier, dans les prélèvements cervico-vaginaux des personnes infectées. Ce travail obéit à un double objectif, épidémiologique et clinique.

Les méthodes actuelles (culture, ELISA antigène et recherche génomique) ne permettent pas toujours de détecter et identifier tous les cas d'infection, et sont parfois difficiles à mettre en oeuvre.

Les amorces que nous avons définies précédemment sur *T. vaginalis* et les connaissances acquises par Innogenetics (Belgique) sur *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* ont permis de réaliser une PCR avec 3 couples d'amorces. Chaque couple est spécifique d'un agent MST. Cependant, les signaux obtenus pour les différents amplicons ne sont pas suffisamment forts pour permettre une interprétation fiable des résultats.

L'utilisation de sondes radioactives, malgré leur grande sensibilité, pose des problèmes de sécurité, à la fois pour une utilisation en routine mais aussi pour être transférée dans les pays en développement.

Dans ce contexte, le concept de la méthode "Line Probe Assay" (LiPA) est une alternative très intéressante, puisqu'elle permet une amplification non radioactive des signaux obtenus dans une PCR multiplex. Le LiPA a déjà été utilisé avec succès par Innogenetics pour le typage des virus de l'hépatite C (Stuyver et coll., 1993).

Un travail en partenariat avec Innogenetics (Gent, Belgique) nous a permis de mettre en oeuvre le diagnostic simultanée de *C. trachomatis* et de *N. gonorrhoeae* par cette méthode LiPA 1

B. Matériel et Méthodes

1. Souches et origine des prélèvements

Les souches de *C. trachomatis* (LGV II et LB) et la souche de *N. gonorrhoeae* ont été isolées au Centre Hospitalier Régional de Montpellier.

Une première étude a porté sur 200 prélèvements cervico-vaginaux provenant de femmes enceintes suivies en P.M.I. à Libreville (Gabon). Pour chaque femme examinée, un écouvillon a été prélevé pour examen direct, un autre pour culture de gonocoque et recherche d'antigène Chlamydia par ELISA (Syva), et enfin un dernier écouvillon était en milieu de transport classique pour PCR et LiPA ultérieurs.

2. Principe de la méthode "Line Probe Assay" (LiPA)

Cette technique consiste en une hybridation inverse des produits de la PCR multiplex avec des sondes ADN homologues préalablement fixées sur une membrane.

La figure 1 donne une représentation schématique du principe du LiPA. Un prélèvement cervico-vaginal est lysé et la PCR est réalisée avec des amorces biotinylées spécifiques de *C. trachomatis* et de *N. gonorrhoeae*. Après contrôle de l'amplification en électrophorèse sur gel d'agarose, les produits de la PCR sont dénaturés et hybridés avec des sondes spécifiques de la cible, préalablement fixées sur une membrane (Lc, ligne de contrôle; SNg, sonde de *N. gonorrhoeae*; SCt, sonde de *C. trachomatis*). La PCR s'effectuant avec des amorces biotinylées, la révélation se fait par une réaction colorimétrique utilisant l'interaction streptavidine/phosphatase alcaline.

PRELEVEMENT CERVICO-VAGINAL

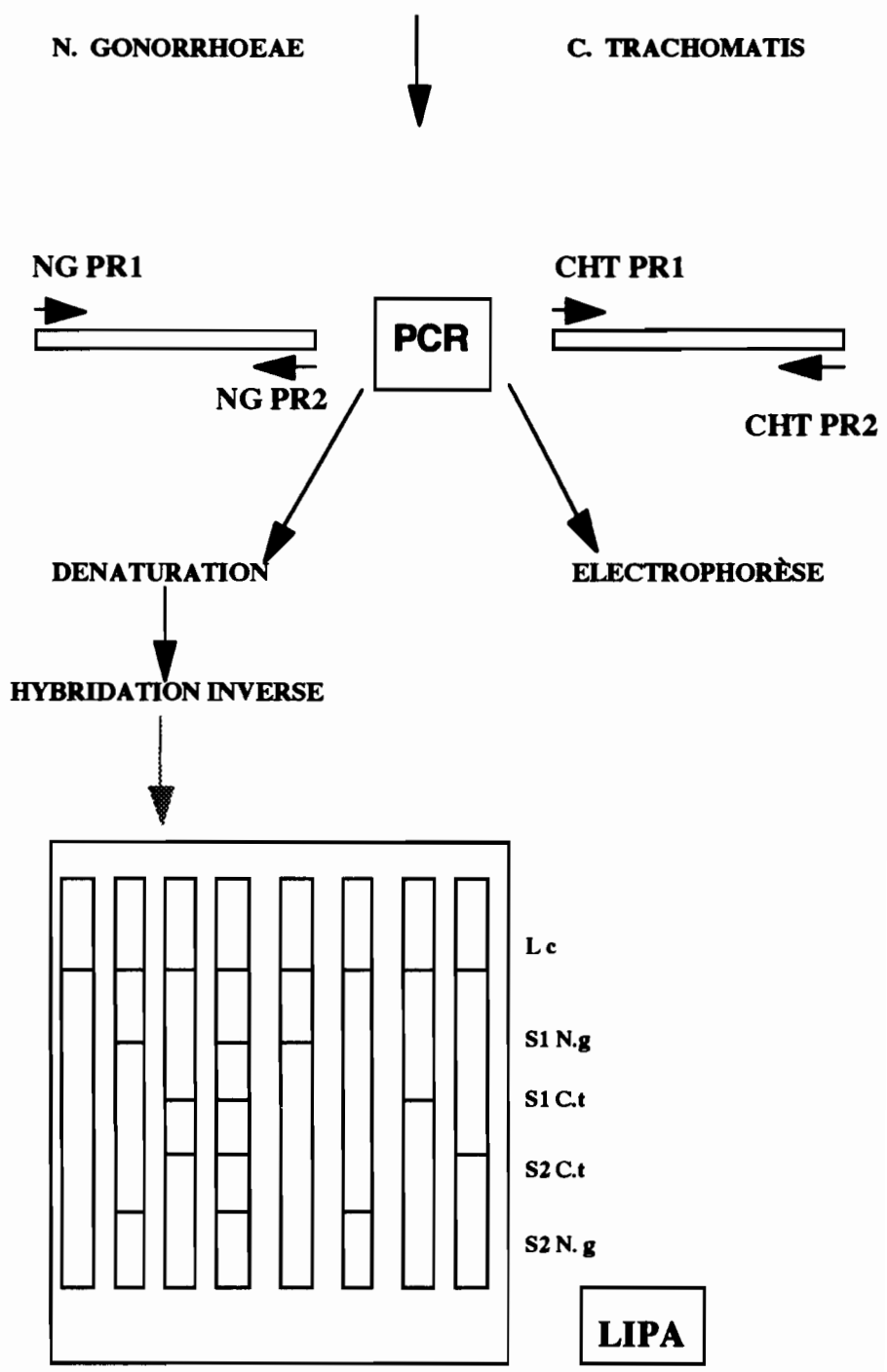


Figure 1: Représentation schématique du principe de "Line Probe Assay" (LiPA)

3. Amorces et sondes

Les amorces ont été choisies à partir des séquences publiées et des séquences faites à Innogenetics. Il s'agit de : CHTR PR1-bio et CHTR PR2-bio pour *C. trachomatis*, et de NG PR1-bio et NG PR2-bio pour *N. gonorrhoeae*.

L'hybridation inverse fait intervenir 2 sondes pour *C. trachomatis* et 1 sonde pour *N. gonorrhoeae*.

Les amorces et les sondes utilisées dans ce LiPA ont fait l'objet d'un contrat de confidentialité avec Innogenetics (Belgique).

C. Résultats du LiPA

Avec cette technique, la sensibilité de détection de *N. gonorrhoeae* et de *C. trachomatis* est améliorée dans la mesure où l'on observe plus de positifs par rapport aux méthodes classiques. En ce qui concerne *N. gonorrhoeae*, nous détectons 5% de positifs, contre 2% détectés par culture. En ce qui concerne *C. trachomatis*, nous détectons 15,5% de positifs, au lieu de 12,5% par ELISA-antigène.

Nous avons intégré à cette étude le diagnostic de *T. vaginalis* par PCR. Les résultats donnent 21% de sujets positifs, contre 12% par examen microscopique.

LiPA sur *N. gonorrhoeae* et *C. trachomatis*, et PCR sur *T. vaginalis* ont été évalués par comparaison avec une hybridation des produits utilisant des sondes homologues radioactives. Nous confirmons par cette méthode tous les résultats obtenus pour chaque diagnostic.

Ce travail a fait l'objet d'une publication (n°2).

D. Discussion et conclusion

Face aux inconvénients que présente l'utilisation de la PCR et des sondes ADN classiques pour la détection et l'identification des infections causées par les agents MST, le concept de Line Probe Assay a été développé. Le LiPA a déjà été utilisé avec succès à Innogenetics pour la détection des mutations et dans le typage du virus de l'hépatite C (Stuyver et coll., 1993).

Cette technique présente l'avantage de pouvoir être utilisée pour la détection simultanée et l'identification de plusieurs infections dans le même échantillon. Elle est facile à automatiser et autorise en outre l'utilisation simultanée de plusieurs sondes. Les premiers résultats montrent que ce test multiparamétrique non radioactif a une sensibilité et une spécificité de détection élevées par rapport aux méthodes classiques.

La méthodologie LiPA utilise de faibles quantités de réactifs et produits. La possibilité d'automatiser la technique, le fait de traiter plusieurs échantillons simultanément permet ainsi de gagner en temps et en coût. Ces avantages font du LiPA une méthode de choix pour l'avenir.

Cependant ce test, qui est encore en cours d'évaluation pour la détection multiplex, présente quelques imperfections en particulier au niveau de l'intensité du signal. Nous avons jugé nécessaire d'améliorer le seuil de détection obtenu précédemment.

Pour cela, il est important d'avoir des amorces capables d'engendrer des fragments PCR uniques et de taille assez proche pour les deux agents, mais il est aussi important de disposer de plusieurs sondes, nous permettant de couvrir une gamme de sérotypes la plus large possible.

En ce qui concerne le premier aspect, la taille des fragments uniques obtenus dans le LiPA est de 600 paires de bases pour *N. gonorrhoeae*, contre 200 paires de bases pour *C. trachomatis*. Au cours de la PCR multiplex, il y a une compétition pour la synthèse des différents produits. La différence de taille des amplicons désavantage l'amplification du fragment de plus grande taille, au bénéfice du fragment de plus petite taille. C'est ainsi qu'un deuxième couple d'amorces spécifiques de *N. gonorrhoeae* (NG PR2-bio et NG PR3-bio), générant un fragment de 150 paires de bases, a été choisi.

En ce qui concerne le deuxième aspect, une troisième sonde a été ajoutée au LiPA, étant donné la variabilité des souches de *C. trachomatis*.

Les résultats du premier test du LiPA n°2 sont représentés sur la figure 2.

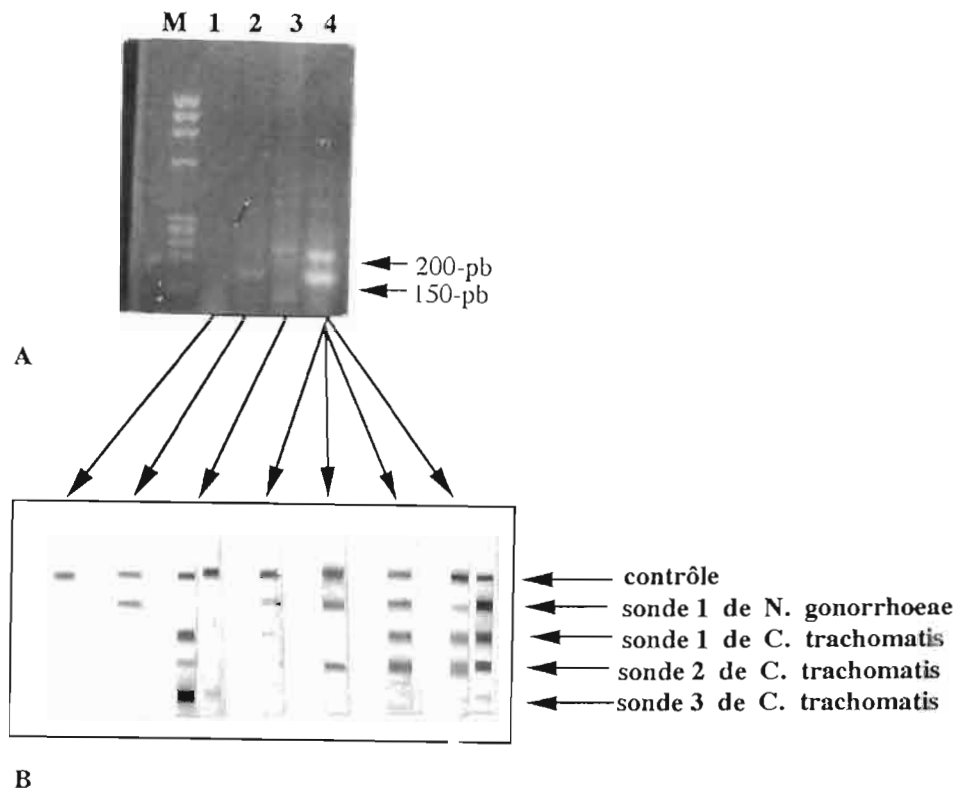


Figure 2 : Détection de *C. trachomatis* et de *N. gonorrhoeae* par LiPA. **(A)** Profils des PCR après migration sur gel d'agarose 1%. M: marqueur Φ X174/ HaeIII; 1: témoin négatif (eau stérile); 2: *N. gonorrhoeae* ; 3: *C. trachomatis* 4: *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae*. **(B)** différents types de profils LiPA correspondants obtenus après hybridation avec les différentes sondes spécifiques.

Publication N°2

**Simultaneous detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*
by Line Probe Assay, a multiparameter analysis technique.**

Pierre Kengne et coll.

Laboratoire Rétrovirus, ORSTOM, 911, avenue d'Agropolis, B.P. 5045, 34032
Montpellier, France.

Corresponding author: Pierre Kengne, Laboratoire Rétrovirus, Institut Français de
Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM), 911,
avenue d'Agropolis, B.P. 5045, 34032 Montpellier cdx. 1, France. Tél: (33) 67617464;
Fax: (33) 67547800.

Les résultats des études présentées dans cette publication sont à visée commerciale et
font l'objet d'un contrat de confidentialité avec Innogenetics (Belgique), entreprise
privée avec laquelle nous travaillons en partenariat. C'est la raison pour laquelle l'article
n'a pas encore été soumis pour la publication.

Abstract

Genitourinary infections with *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, and *Trichomonas vaginalis* are widespread inflammatory sexually transmitted diseases (STD). These pathogens are more common than genital ulceration, and may act by enhancing the sexual transmission of human immunodeficiency virus (HIV). Diagnosis of these pathogens in women using laboratory tests are often time-consuming, poorly sensitive, and difficult to perform several days after sample collection. The line probe assay (LiPA) used to detect *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* is a reverse hybridization assay of specific nucleic acid multiplex amplification products. After amplification by polymerase chain reaction (PCR) and hybridization, the bound biotinylated product was visualized with a streptavidine/alkaline phosphatase conjugated system. LiPA was performed for simultaneous detection of pathogens and for a better sensitivity and specificity of the detection, in comparison with classical laboratory tests. This multiplex assay to detect *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* in endocervical samples from 200 pregnant Gabonese women (Central Africa) was compared to ELISA antigen techniques and culture. The sensitivity and specificity of the LiPA are extremely high. Additionally, PCR and radioactive hybridization reported here showed an increase in sensitivity for detection of *T. vaginalis* over conventional methods. The multiplex assays were highly effective for the simultaneous detection of *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* in endocervical swab samples from women with or without clinical signs of genitourinary infection. This technique allows to diagnose simultaneously different STDs and help us to better define the epidemiology, the pathogenesis, and the treatment of these infections. It would be of great importance for epidemiological studies and to define public health interventions.

Introduction

Chlamydia trachomatis, *Neisseria gonorrhoeae* and *Trichomonas vaginalis* are widespread non-ulcerative sexually transmitted disease pathogens (STD), especially in sub-Saharan African countries. These pathogenic agents are the main cause of genitourinary syndromes in men and women (Laga *et al.*, 1990, 1993). Many studies showed that, in both homosexual and heterosexual populations, ulcerative and non-ulcerative STDs are more prevalent among HIV-infected people than in control groups (Cameron *et al.*, 1990; Plummer *et al.*, 1991; Wasserheit *et al.*, 1992). It has also been reported that the presence of STDs in seronegative individuals may increase the sexual transmission of HIV within these individuals (Piot *et al.* 1990; Laga *et al.*, 1993). Recent studies (Wasserheit *et al.* 1992; Torian *et al.*, 1995) showed a strong link between ulcerative STDs and HIV transmission. However, since non-ulcerative STDs are more common than genital ulcerations, they may be responsible for the largest proportion of HIV transmission. Detection of these STD pathogenic agents is very important, not only because of the pathogenesis of STDs, but also because of their interaction with HIV.

Currents methods to detect these agents, such as wet mount observation, ELISA antigen, and culture have not been found very sensitive (Krieger *et al.*, 1988; Wu *et al.*, 1992; Panke *et al.*, 1991; Bobo *et al.*, 1991). Cervical specimens for culture must be preserved in transport medium at room temperature for less than 12 hours (Birkenmeyer *et al.*, 1992; Mahony *et al.*, 1995). *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* usually are diagnosed individually by current laboratory techniques. The sensitivity of these techniques is quite low with as many as 10-15% of undetected cases of *N. gonorrhoeae* that could conduct infected women to develop gonococcal pelvic infection, and in some cases sterility (Sherman *et al.*, 1990). Isolation technique, which has been considered for many years the gold standard diagnostic test of these

infections, do not allow to establish their real prevalence rate. Therefore, there is a real need for more sensitive and specific techniques.

The past few years, new techniques have been developed to increase the sensitivity of cell culture (Wu *et al.*, 1992). The polymerase chain reaction (PCR) and Ligase chain reaction (LCR) have recently been reported as sensitive and specific methods for individually detection of numerous infectious agents (for review, see Lee *et al.*, 1995). Using multiplex PCR technique for multi-factorial detection with different primer sets in the same clinical specimen may be insufficient to detect all pathogens, because of the level of the signal. In these conditions, hybridization assays may be used to improve nucleic acid amplification techniques. The alternative of using different test procedures to detect multiple factors on any clinical sample is often laborious, time-consuming and expensive. Amplified DNA techniques that are still expensive for routine diagnostic, could be used for epidemiological studies in STD control programs.

In order to assess an accurate diagnosis method to simultaneously detect *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* in clinical samples, we decided to evaluate Line Probe Assay (LiPA), a multifactorial analysis technique (Stuyver *et al.*, 1993, 1994). This LiPA technique is based on the reverse hybridization principle of PCR amplification products, using membrane strips onto which capture probes are applied in a line-wise fashion (Innogenetics). We report in the present study the simultaneous detection and the prevalence of *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* by LiPA technique, and the prevalence rate of *T. vaginalis* by PCR in 200 Gabonese pregnant women, compared to the radioactive hybridization.

Materials and methods

Sample collection

A total of 200 endocervical swabs were obtained from women attending antenatal clinics in Libreville (Gabon). Three swabs were collected for different clinical diagnostic procedures: (i) direct examination for *T. vaginalis* (Gram+), (ii) *N. gonorrhoeae* culture, and (iii) *C. trachomatis* SYVA/ELISA-antigen test. The remaining swabs were placed in transport medium (Syva), and stored at -20°C for subsequent PCR and LiPA. The two strains of *C. trachomatis* (LGV II and LB) and the strain of *N. gonorrhoeae* were isolated from clinical material from the Regional Hospital Center of Montpellier (France).

Sample preparation

Cultured strains and clinical specimens in transport media were thawed and vortexed during 15 sec. An aliquot of 100 µl was boiled for 3 minutes and lysated by adding proteinase K to a final concentration of 200 mg/ml and incubated for 1 hour at 60°C. Lysates were subsequently heated at 95°C during 10 min to inactivate the proteinase K. 10 µl of lysates were used directly for PCR amplification or pelleted by centrifugation for 10 minutes at 4°C (12 000 g) to remove insoluble debris before PCR processing (Kawasaki *et al.*, 1990; Innis *et al.*, 1990).

Oligonucleotide primers

Four different primers (100 picomole/µl each) were provided by Dr. Rossau (Innogenetics) for LiPA: CHTR PR1-bio and CHTR PR2-bio for *C. trachomatis*; NG PR1-bio and NG PR2-bio for *N. gonorrhoeae*. A third couple of primers TVK3 and TVK4 (Kengne *et al.*, 1994) was also used for *T. vaginalis* PCR detection. The latter primers were synthesized on a nucleic acid synthesizer (Applied Biosystem, USA).

DNA Amplification

PCR was performed on 10 μ l of lysate in a total volume of 50 μ l. The final reaction mixture contained 100 pmol of each primer; 200 mM of each dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8.3; 2 mM MgCl₂; 0.01% gelatine, and 2.5 U of *Thermus aquaticus* polymerase (Promega, US), overlaid with 100 μ l of mineral oil.

Lysates were subjected to 35 cycles of amplification in a thermal cycler (PHC2, Techne, UK). PCR consisted in a denaturation step at 90°C for 1 min, annealing at 50°C for 30 sec and elongation at 70°C for 2 min. PCR products were separated by electrophoresis in 1.5% agarose gel containing 0.5 μ g/ml of ethidium bromide, and photographed under UV light.

Hybridization Line probe assay and Colour development

The reverse hybridizations were performed using membrane strips onto which capture probes are applied as lines on well defined locations (Stuyver *et al.*, 1993). The strips were put in the troughs. A quantity of 10 μ l of amplified PCR products were denatured during 5 min with 10 μ l of denaturation solution (400 mM NaOH, 10 mM EDTA) at room temperature. Then 1 ml of hybridization mix (Inno-LIA kit) was added and incubated at 50°C during 1 hour in a shaking water bath. After hybridization, the mix was removed and the strips were washed twice at 50°C for 30 min using 1 ml of wash solution containing 3M tetramethylammonium chloride (3 M-TMACl); 0.2% SDS; 50 mM Tris-HCl pH 8.0.

The detection of hybrid molecules was achieved by a colour generating detection system based on the biotin-streptavidin interaction. After washings several times, the strips were rinsed with 1 ml of rinse solution (Inno-LIA kit), and incubated in 1 ml of diluted conjugate at room temperature for 30 min while shaking. The conjugate was removed by washing 3 times in rinse solution and substrate diluent (Inno-LIA kit). The strips were then incubated in 1 ml of substrate solution (BCIP and BBT in substrate diluent) for 30 min at room temperature while shaking (Stuyver *et al.*, 1993). The

colour development was stopped by adding 1 ml of TE buffer. A sample is reactive when the intensity of colour development is equal to the intensity of the conjugate control line.

Southern blotting, DNA probes labelling and hybridization.

PCR products were resolved in 1.5% agarose gels (Genetic Technology Grade, USA). After alkaline treatment of the gel with 0,5 M NaOH and 1,5 M NaCl, DNAs were transferred onto charged nylon membrane, Hybond N+ (Amersham, UK), using a vacuum blotting apparatus (Millipore, USA), or by pocket-blotting technique (Cuny *et al.*, 1991).

A 200-bp and a 625-bp fragments were generated by PCR amplification of *C. trachomatis* LB subtype I strain with primers CHTR PR1-bio and CHTR PR2-bio, and of a strain of *N. gonorrhoeae* with primers NG PR1-bio and NG PR2-bio respectively. Amplified DNA was separated in low melting 1.5% agarose gel (Genetic Technology Grade, USA), subsequently eluted using Genclean kit (BIO 101, USA) or WIZAR™ (Promega, France), and stored at -20°C until use.

Twenty five nanograms of the 200-bp and 625-bp of the two bacteria *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* DNA and a 350-bp fragment from *T. vaginalis* DNA were labelled with [³²P]dCTP using the Megaprime random-labelling system (Amersham, UK). After 30 min pre-hybridization of membranes in the rapid hybridization buffer (Amersham, UK) at 65° C, the denatured probe was added and hybridization carried out for 3 hr at the same temperature. Membranes were then washed twice with 2X SSPE (20X SSPE: 3.6M NaCl; 0.2M NaH₂PO₄; 0.002M EDTA), 0.1% SDS at 65° C for 15 min, and once at high stringency in 0.1X SSPE, 0.1% SDS at 65° C for 15 min. Membranes were air-dried and exposed to auto-radiographic films (Hyper film MP, Amersham, UK) for 3 hrs at -80° C.

RESULTS

PCR amplification and hybridization of *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* specific fragments

In order to investigate the use of LiPA technique on swab samples, cultured agents (*C. trachomatis* subtype LGV II and LB, and *N. gonorrhoeae* strain) were subjected to PCR test using primers CHTR PR1/CHTR PR2 and NG PR1/NG PR2, and subsequently reverse hybridized. Organisms, known to be present in genital area, were previously used as negative controls of PCR (*Candida albicans*, *Gardenerella vaginalis*).

The 200-bp and 625-bp fragments were present in the two *C. trachomatis* subtypes and *N. gonorrhoeae* strain respectively. The result indicated that these primers can be used for detection of bacteria (Fig. 1a). In the aim to improve results, PCR products were reverse hybridized with membrane onto which capture probes were applied. All the tested PCR positive samples hybridized with *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* probes on the membrane. In the aim to know if a mixed PCR product can influence the result, we have also tested the hybridization of Chlamydia and Neisseria PCR product performed separately, on the same strip that contained the two bacteria probes. Results were still positive in these conditions. Multiple PCR reactions with the bacteria specific primers showed a banding pattern corresponding to the two-agent-amplified DNA. Reverse hybridization confirmed these results (Fig. 1b). Results indicated that association between PCR and reverse hybridization can be used with a high rate of efficiency on the detection of multiple infectious agents.

Detection of *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* in clinical specimens by LiPA

Endocervical swabs were collected in a transport medium from 200 different patients. After treatment of the clinical specimens (see materials and methods), samples were

PCR processed as described above, using *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* primers separately or simultaneously in a multiplex PCR reaction. In many cases, the 200-bp and 600-bp of the bacteria were present showing differences intensity. Amplified products from multiplex PCR were subsequently hybridized on the strips while those from separated amplification were mixed before hybridization. The signal was stronger for samples processed separately than samples processed simultaneously (data not showed).

Twenty five women were positive for *C. trachomatis* ELISA SYVA whereas samples from 42 women were positive by LiPA. The overall prevalence infection was 15.5% assessed by LiPA, and 12.5% only by antigens detection used in field conditions (Table 1). By endocervical culture, 4 women were positive for *N. gonorrhoeae*, whereas 10 were positive with LiPA. Thus, 6 negative endocervical cultures were positive with LiPA. This represented a prevalence infection of 5% with LiPA versus 2% by culture (Table 1). Four cases (2%) of coinfection were observed with either *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* or *C. trachomatis* and *T. vaginalis*. We also noted the presence of the three pathogen agents in one case.

³²P Radioactive Probe analysing

A 200-bp and 625-bp of *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* were used as labelling probe to analyse amplified products from multiplex PCR reaction, that were transferred onto Hybon N+ nylon membrane. All endocervical specimens that were positive by LiPA were positive using radioactive probe. Negative result by LiPA were confirmed to be negative by ³²P probe. Subsequently amplified product from *T. vaginalis* using TVK3 and TVK4 primers was hybridized with a 350-bp labelling probe. 24 women were positive by wet mount examination whereas 42 were positive by PCR and hybridization. With this PCR method, we detected 2 times more cases of *T. vaginalis* than by microscopic examination (Table 1).

Discussion

Epidemiological studies on the role of STDs in HIV transmission indicated that both ulcerative STDs and non-ulcerative STDs increase the risk for HIV transmission (Laga *et al.*, 1993; Piot *et al.*, 1990). In this context, a better diagnosis of STDs in target populations and a better definition of the epidemiology, pathogenesis and treatment of these infections become quite important. *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* detection has been described by analyses of endocervical swab samples and urine with culture, antigen assay (Chenesky *et al.*, 1990; Larson *et al.*, 1986), nucleic acid amplification (for review see Lee *et al.*, 1995), and non-amplified nucleic acid hybridization techniques. Among recent major biotechnological advances in the development of diagnostic tests for STDs based on amplification and detection of organism specific nucleic acid sequences, only *C. trachomatis* test is currently commercially available.

C. trachomatis and *N. gonorrhoeae* often occurred concomitantly and give similar clinical signs. Simultaneous amplification of nucleic acid targets from multiple agents in a single specimen by multiplex assays may be useful in infection diagnosis. The recently described LiPA technique (Stuyver *et al.*, 1993, 1994) were used in this study as a tool for epidemiological purposes. This method involves PCR and hybridization. PCR was performed directly on clinical samples. DNA extraction would decrease sensitivity because of nucleic acid loss, and would increase the risk of contamination. Other advantage of LiPA technique is the non-isotopic detection. Culture that showed a high specificity is usually considered as "gold standard" analysis method. There was however a substantial variation in the sensitivity of culture among many studies. The efficiency of pathogen isolation depends on the collection technique, transport conditions and storage, and culture system. Methods involving nucleic acid amplification are less susceptible to the degradation caused by these variables. The sensitivity of multiplex DNA amplification methods was enhanced by reverse hybridization. Radioactive probe hybridization were used to confirm the results obtained with LiPA.

LiPA displayed high degrees of reactivity with the strains LB and LGV II of *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae*, when hybridization occurs with PCR product processed separately or simultaneously in stringent conditions. We showed that LiPA detected *Chlamydia* and *Neisseria* more often than classical methods, in all clinical samples used. The problem of using a "gold standard" for calculation of sensitivity and specificity of new techniques has been evoked (Lee *et al.*, 1995). LiPA, or LCR, raised both the sensitivity and the specificity to the level of radioactive detection. All samples positive by antigenic methods were positive by LiPA. Primers used in this study were previously tested with pathogens supposed to be present in genital area.

The degree of reactivity of LiPA decreases when PCR were performed using the two sets of primers for *N. gonorrhoeae* and *C. trachomatis* simultaneously. However, we still detect positive samples already diagnosed with separated PCR and mixed hybridization. Radioactive probe gave results comparable to LiPA. The prevalence of *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* in the population of pregnant women analysed in Gabon by LiPA, was 15.5% and 5% respectively, versus 12% and 2% observed by classical methods. The overall resolved sensitivity of LiPA and radioactivity was 100% for *Neisseria* and *Chlamydia* infections, compared to a sensitivity of 40% for culture and 59% for SYVA tests. The specificity of LiPA was high (Table 1). Now, it is possible to diagnose simultaneously two or more pathogenic agents in the same clinical sample. Coinfection with 2 or 3 non-ulcerative STD agents were detected. Using *T. vaginalis* primer set which demonstrated a strong specificity of diagnosis (Kengne *et al.*, 1994), we found a prevalence rate of 37% versus 12% by wet mount examination.

LiPA technique opens a new field for epidemiological and clinical studies. In the near future, it will be possible to suggest a protocol to detect simultaneously not only inflammatory STD agents (*C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* and *T. vaginalis*), but also other ulcerative STD pathogens. Of great importance in this context is the need of an equilibrium between the number of repetitions, the size of PCR targets, and the final PCR reaction mixture. Others studies will improve the use of LiPA in different clinical

samples such as urine samples or other fields of research as typing and nucleotide mutation analysis. Therefore, we can lower the cost of sensitive nucleic acid analysis using multifactorial studies. If we want to control the spread of STD infection and their complications, it is urgent to diagnose and treat these infections. Sensitive and cheap diagnosis techniques, in condition of low infectious agents load in developing countries, are necessary. Considering that most STDs act on the transmission of HIV, effective STD control must be performed if we want to prevent AIDS spread especially in Africa. LiPA appears to be one of most sensitive and specific approach for diagnosing endocervical multiple infections. It could be used mainly as a tool in epidemiological and public health studies in developping countries, and in clinical studies in other parts of the world. These studies will enable to evaluate not only a sanitary situation, but also the impact of public health interventions.

References

Birkenmeyer L. and Armstrong A. Preliminary evaluation of the ligase chain reaction for specific detection of *N. gonorrhoeae*. *J. of Clin. Microbiol.* 1992, **30**: 3089-3094.

Bobo L., Munoz B., Viscidi R., Quinn T., Mkocho H., West S. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* eye infection in Tanzania by polymerase chain reaction/enzyme Immunoassay. *Lancet* . 1991, **338**: 847-850.

Cameron W. D. and Padian S. N. Sexual transmission of HIV and the epidemiology of other sexually transmitted diseases. *AIDS*. 1990, **4**: s99 - s103.

Chapin-Robertson K. Use of molecular diagnostics in sexually transmitted diseases. *Diagnostic Microbiology and infectious Disease* . 1993, **16**: 173-184.

Chernesky , M.A., Castriciano S., Sellors J., Stewart I., Cunningham I., Landis S., Seidelman W., Grant L., Devlin C. and Mohony J. Detection of *Chlamydia trachomatis* antigens in urine as an alternative to swabs and cultures. *J. Infect. Dis.* 1990, **161**: 124-126.

Cuny, G., Veas, F. and Roizès, G. "Pocket-blotting": A method for transferring nucleic acids onto nylon membranes. *Anal. Biochem.* 1990, **193**: 45-48.

Innis, M.A. and Gelfand, D.H., Optimisation of PCRs. In: *PCR protocols: a guide to methods and application*, Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds.), Acad. Press, San Diego, 1990, 3-12.

Kawasaki, E.S., Sample preparation from blood, cells, and other fluids. In: *PCR protocols: a guide to methods and applications* , Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White T.J. (eds.), Acad. Press, San Diego, 1990, 146-152.

Krieger, J.N., Milton, R.T., Stevens, C.E., Nielsen, I.O., Hale, J., Kiviat, N.B. and Holmes, K.K., Diagnosis of Trichomoniasis: comparison of conventional wet-mount examination with cytologic studies, cultures, and monoclonal antibody staining of direct specimens. *JAMA*. 1988, **259**: 1223-1227.

Laga, M., Manoka, A., Kivuvu, M., Malele, B., Tuliza, M., Nzila, N., Goeman, J., Behets, F., Batter, V., Alary, M., Heyward, W.L., Ryder, R. W. and Piot, P., Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. *AIDS*. 1993, **7**: 95-102.

Laga, M., Nzila, N., Malele, M., Bush, T.J., Behets, F., Heyward, W.L., Piot, P. and Ryder, R. Non ulcerative sexually transmitted diseases (STD) as risk factors for HIV infection, abstr. Th. C.97. Sixth International Conference on AIDS, San Francisco, June 1990, 20-24.

Larson J., Wulff H. and Friis-Moller A. Comparison of a fluorescent monoclonal antibody assay and a tissue culture assay for routine detection of infections caused by *Chlamydia trachomatis*. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 1986, **5**: 554-558.

Lee H.H., Chernesky M.A., Schachter J., Burczak J.D., Andrews W.W., Muldoon S., Leckie G. and Stamm W.E. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* genitourinary infection in women by ligase chain reaction assay of urine. *Lancet* 1995, **28**: 213-216.

Mahony J.B. and Chernesky M.A. Effect of swab type and storage temperature on the isolation of *C. trachomatis* from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1985, **22**: 865-867.

Mullis, K.B. and Faloona, F.A., Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987, **155**: 335-350.

Panke E.S., Yang L.I., Leist P.A., Magenney P., Fry R.J. and Lee R.F. Comparison of Gen-probe DNA probe test and culture for the detection of *N. gonorrhoeae* in endocervical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1991, **29**: 883-888.

Piot P. and Tezzo R. The epidemiology of HIV and other sexually transmitted infection in the developing world. *Scand. J. Infect. Dis.* 1990, **69**: s89-s97.

Plummer F.A., Simonsen J.N., Cameron D.W., Ndinya A.J., Kreiss J.K., Gakinya M.N. *et al.* Cofactors in male-female sexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Infected Disease.* 1991, **163**: 233-239.

Sherman K.J., Daling J.R., Stergachis A., Weiss N.S., Foy H.N., Wang S.P. and Grayston J.T. Sexually transmitted diseases. and tubal pregnancy. *Sexually Transmitted Diseases.* 1990, **17**: 115-121.

Stuyver L., Rossau R., Wyseur A., Duhamel M., Vanderborght B., Van Heuverswyn H., and Maertens G. Typing of C. virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *Journal of General Virology.* 1993, **74**: 1093-1102.

Stuyver L., Van Arnhem W., Wyseur A. Hernandez F., Delaporte E. and Maertens G. Classification of hepatitis C. viruses based on phylogenetic analysis of the envelope 1

and nonstructural 5b regions and identification of five additional subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994; **91**: 1-5.

Torian L.V., Weisfuse I.B., Makki H.A., Benson D.A., DiCamillo L.M., Toribio F.E. Increasing HIV-1 seroprevalence associated with genital ulcer disease, New York City, 1990-1992. *AIDS*. 1995; **9**: 177-181.

Wasserheit J.N: Epidemiological synergy: interrelationships between human immunodeficiency virus infection and other sexually transmitted diseases. *Sex. trans. dis.* 1992, **19**: 61-77.

Wilde J., Eiden J. and Yolken R. Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions. *J. Clin. Microbiol.* 1990, **28**: 1300-1307.

World Health Organisation. Programme for Sexually transmitted diseases. WHO/VDT/89. 443

Wu C.H., Lee M.F., Yin S.C., Yang D.M. and Cheng S.F. Comparison of polymerase chain reaction, monoclonal antibody based enzyme immunoassay and cell culture for detection of *Chlamydia trachomatis* in genital specimens. 1992, **19**: 193-197.

Table 1: Prevalence of *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* and *T. vaginalis* in a P.M.I. (Libreville, Gabon)

	Number (%) positive	Sensitivity (%)	Specificity (%)
<i>N. gonorrhoeae</i>			
Culture	4 (2%)	40% (4/10)	
LIPA	10 (5%)	100% (10/10)	96.93% (190/196)
³² P probe	10 (5%)	100% (10/10)	
<i>C. trachomatis</i>			
SYVA	25 (12.5%)	80.6% (25/31)	
LIPA	31 (15.5%)	100% (25/25)	96.5% (169/175)
³² P probe	31 (15.5%)	100% (25/25)	
<i>T. vaginalis</i>			
wet mount	24 (12%)	57.1% (24/42)	
PCR	42 (21%)	95.2% (40/42)	
³² P probe	42 (21%)	100% (42/42)	100%

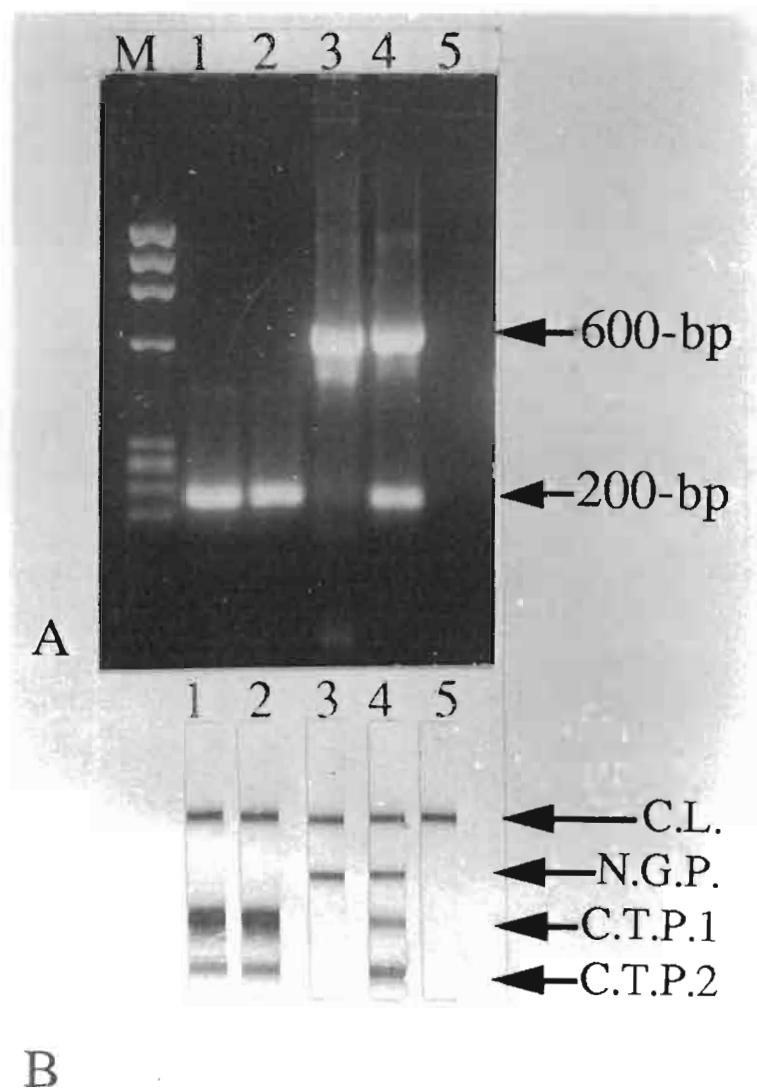


Fig 1: Direct and specific detection of *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* by PCR amplification and Line probe assay. (A): 1.5% agarose gel electrophoresis of DNA amplified products from different cultured strains using: CHTR PR1-bio and CHTR PR2-bio for *C. trachomatis*; and NG PR1-bio and NG PR2-bio for *N. gonorrhoeae*., and (B) specific colour strip banding patterns (Lanes M: ϕ x174 Hae III. 1: *C. trachomatis* (serotype LB); 2: *C. trachomatis* (serotype LGV); 3: *N. gonorrhoeae*., 4: *N. gonorrhoeae*. and *C. trachomatis* ; Lane: 5, milli-Q water

Conclusions Chapitre I (II)

Mise au point et évaluation du diagnostic simultané de *C. trachomatis* et de *N. gonorrhoeae* par la méthode LiPA

(i) - Face aux inconvénients que présente l'utilisation des méthodes classiques pour la détection et l'identification des agents pathogènes responsables de certaines formes cliniques des MST, nous avons développé une nouvelle méthode pour le diagnostic simultané de *C. trachomatis* et de *N. gonorrhoeae*. Nous avons intégré au cours du développement de la méthode, les exigences de spécificité, sensibilité, rapidité et simplicité. Cette méthode originale, développée en partenariat avec Innogenetics (Belgique), est basée sur une technique de PCR multiplex, couplée à une hybridation inverse non radioactive. La méthode est appelée "Line Probe Assay", et elle est destinée à être commercialisée. Le test de détection de *T. vaginalis* par PCR a été ajouté par la suite à notre étude, qui fait l'objet d'un article à publier.

(ii) - Les résultats obtenus à partir de 200 prélèvements cervico-vaginaux du Gabon et du Sénégal, effectués par écouvillonnage ou par lavage, donnent un taux de positifs de plus de 40% supérieur aux tests classiques (pour *N. gonorrhoeae* et *T. vaginalis*) ou de 19% supérieur au test ELISA (pour *C. trachomatis*). Le diagnostic par marquage "froid" s'est avéré aussi sensible que le marquage radioactif contrôle. Nous avons pu détecter avec cette méthode de nombreux cas de patients asymptomatiques, tout comme avec la PCR sur *T. vaginalis*.

(iii) - Ces résultats permettent d'envisager l'utilisation de ces méthodes pour : préciser les caractéristiques épidémiologiques en fonction des différents contextes infectieux, tester l'efficacité de traitements prophylactiques, mieux appréhender l'évolution des co-infections avec le VIH, et en définitive pour mieux évaluer les programmes d'intervention en santé publique, en abaissant leur coût et en augmentant le nombre de cas testés dans une enquête.

Résultats : chapitre II

Chapitre II: Charge virale dans le plasma et les sécrétions cervico-vaginales chez des patientes infectées MST/VIH

Lorsque nous avons commencé ce travail, les méthodes récentes de quantification directe du virus, commercialisées sous les noms de "branched DNA assay" (Chiron), NASBA, et "immunocapture RT-PCR (Roche Molecular Systems), n'étaient pas encore disponibles (Lin et coll. 1994; Dewar et coll., 1994). Il nous a paru important de mettre en oeuvre une méthode PCR sensible et facilement utilisable, pour la détection et la quantification d'ADN et d'ARN viral dans le sang, mais aussi dans les sécrétions génitales.

I. Mise au point de méthodes de détection et de mesure semi-quantitative du VIH dans le plasma et les sécrétions cervico-vaginales

La technique de polymérisation en chaîne peut accroître le nombre de copies d'un fragment d'ADN cible. Cette technique PCR, qui s'adresse à l'ADN, a été adaptée pour l'ARN après couplage à une réaction de rétro-transcription de la cible ARN en ADN complémentaire (ADNc), grâce à l'enzyme reverse transcriptase (RT). Ce système, désigné RT-PCR, a été développé pour la première fois en 1988 par Rappolee et Chelly. La RT-PCR est une technique très intéressante pour la détection et la quantification des virus à ARN dans le plasma, mais aussi dans les sécrétions.

A. Principe général de la PCR quantitative appliquée au VIH

La quantification du VIH par PCR utilise généralement des amorces permettant d'amplifier une région du gène *gag* du virus. La formation de la particule virale est en effet dépendante de la protéine *gag* (voir le cycle viral dans la partie "Etat des Connaissances").

La quantification par PCR utilise également un standard VIH, sous la forme d'une construction plasmidique dans laquelle est inséré le gène *gag* du virus, et dont on connaît précisément le nombre de copies par unité de volume.

1. PCR non compétitive

On réalise des réactions d'amplification pour différentes dilutions du plasmide. Les signaux obtenus sur cette gamme permettent d'établir une relation directe entre l'intensité du signal PCR et le nombre de copies.

Après amplification de l'ADN cible, il suffit alors d'appliquer la valeur du signal de l'échantillon à quantifier sur la droite de régression obtenue avec l'ADN standard.

Cette méthode, qui utilise un standard externe, est dite non compétitive. Son principe est schématisé sur la Figure 1a.

2. PCR compétitive

Une alternative a été mise au point pour réaliser une mesure plus précise, par compétition entre l'ADN standard et l'échantillon à quantifier.

Une même quantité d'échantillon est ajoutée à chaque point de la gamme du standard, qui devient alors standard interne à la PCR.

Dans ce cas de figure, il est indispensable de pouvoir différencier le produit PCR de l'ADN standard du produit PCR de l'ADN cible. Cette difficulté est levée par l'utilisation d'une construction plasmidique différente de la précédente, et dans laquelle le gène *gag* est délété de 80 paires de bases.

Au cours de l'amplification, il y a compétition entre le standard et l'échantillon. La droite de régression est obtenue en portant le rapport des signaux PCR en fonction du nombre de copies. Un rapport égal à 1 donne le point d'équivalence.

Le principe de la PCR compétitive est illustré sur la Figure 1b.

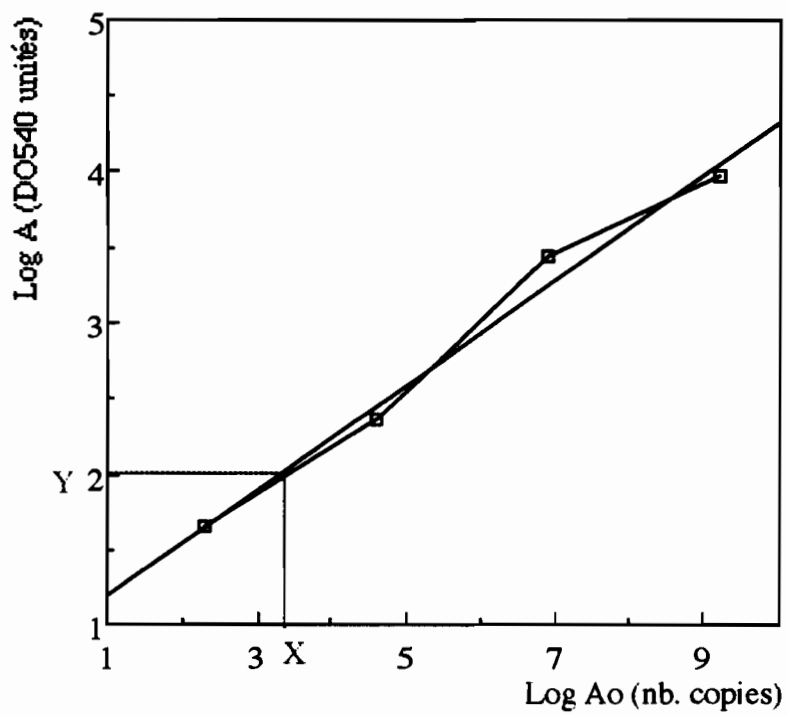
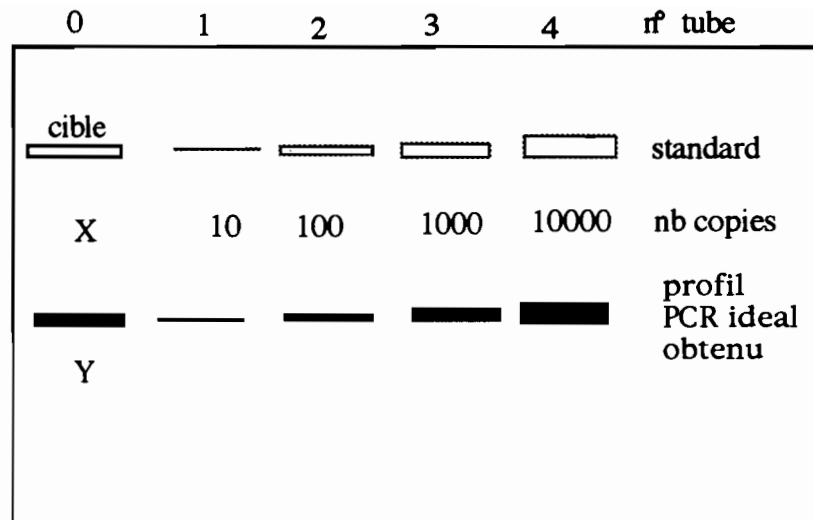
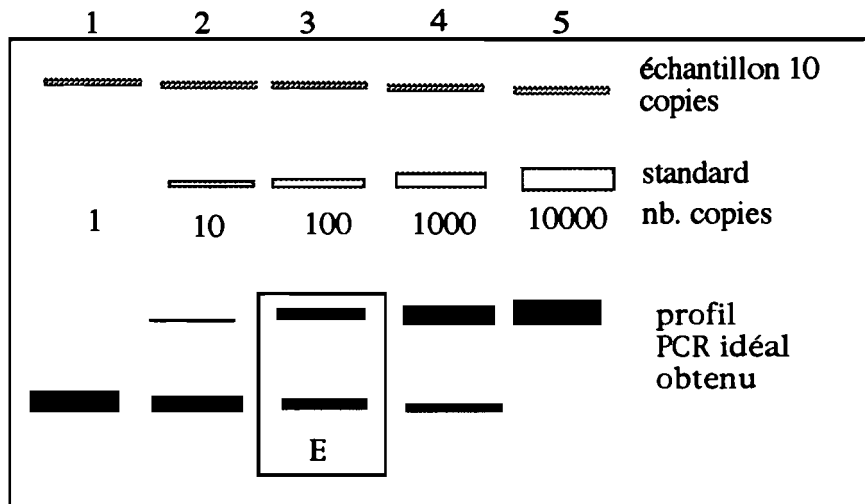
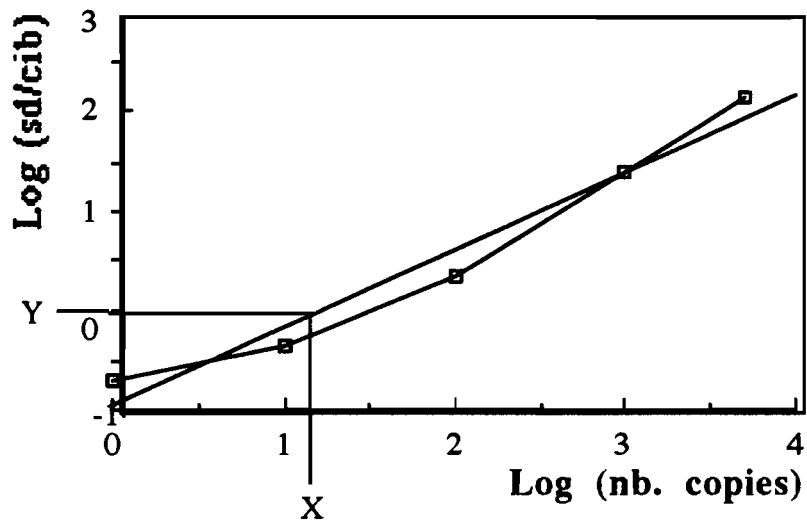


Figure 1a: Représentation schématique du principe de la PCR non compétitive.



A



B

Figure 1b: Représentation schématique du principe de la quantification par PCR compétitive

3. Standards utilisés pour la quantification

Les constructions plasmidiques pQP1 et pQPΔ80, utilisées respectivement en PCR non compétitive et en PCR compétitive, ont été gracieusement fournies par le Docteur Michael Piatak (Genelabs Technologies Inc, USA).

Ces constructions ont aussi l'avantage de contenir le promoteur de la T7RNA polymérase, ce qui permet d'obtenir des copies d'ARN par transcription.

Nous avons également été amenés à utiliser un autre standard, élaboré pour la quantification du provirus intégré dans les cellules.

Les cellules LAV-8E5 fournies par le NIH (USA) sont des lignées contenant une copie par cellule de VIH-1 sous forme provirale. Le virus est modifié au niveau du LTR, empêchant ainsi toute multiplication virale.

La quantification se fait directement sur cellules lysées, ce qui permet de s'affranchir d'une étape de purification de l'ADN.

B. Matériel et méthodes

Nous expliquerons brièvement les méthodes classiques de biologie moléculaire, qui ont été nécessaires à la préparation de la quantification.

1. Origine des échantillons

Les échantillons sanguins utilisés dans cette étude proviennent de CHR et du Centre de Transfusion Sanguine de Montpellier. La séparation des éléments sanguins a été réalisée au centre ORSTOM.

Les lavages cervico-vaginaux et les plasmas proviennent de l'Institut d'Hygiène Sociale de Dakar (Sénégal), et des P.M.I. de Libreville (Gabon).

2. Préparation des échantillons sanguins et cervico-vaginaux

a. Séparation des éléments sanguins

Dix millilitres de sang sont recueillis sans anticoagulant. Après centrifugation à 200 g pendant 15 minutes, le plasma est soigneusement aspiré et centrifugé à 1000 g pendant 10 minutes pour enlever les débris cellulaires restants, et conservé à -70°C. Les cellules (PBMCs) sont ensuite isolées par Ficoll-plaque (Sigma) et aliquotées en fractions de 10^4 à 10^6 cellules dans 10 μ l d'un tampon de lyse (Tris-HCl 10 mM pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl₂ 2 mM; Tween 20 0,5%; NP-40 0,5%; protéinase K 100 μ g/ml).

b. Préparation des PBMCs

Les PBMCs sont incubées dans le tampon de lyse à 65°C pendant 1 heure, suivi de l'inactivation de la protéinase K à 95°C pendant 10 minutes. Après mélange, les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation et le surnageant est utilisé directement dans les réactions d'amplification.

c. Extraction de l'ADN cellulaire

L'extraction de l'ADN à partir des cellules contenues dans les lavages vaginaux se fait selon une méthodologie rapide utilisant le kit Isoquick (Microprobe, USA).

Brièvement, les cellules culottées par centrifugation à 1000 g sont reprises dans un tampon de lyse. Le lysat est mélangé avec un réactif d'extraction contenant une résine qui fixe les nucléases. Après centrifugation, les acides nucléiques sont prélevés dans la phase aqueuse, puis précipités.

d. Extraction de l'ARN plasmatisque et des sécrétions cervico-vaginales

L'ARN est extrait selon une méthodologie RNAnow (Ozyme, France), adaptée à partir de celle décrite par Chomzyski et coll., (1987). Cette méthode permet d'obtenir de l'ARN non contaminé par l'ADN cellulaire.

Les particules virales sont récupérées par ultracentrifugation des prélèvements cervico-vaginaux et du plasma à 70000 rpm pendant 15 minutes.

Après homogénéisation dans une solution d'extraction ou de lyse, on réalise une extraction à froid au chloroforme puis une centrifugation à 12000 g à 4°C pendant 15 minutes.

L'ARN contenu dans la phase aqueuse est précipité à froid avec 1/2 volume d'isopropanol. Il est nécessaire d'entraîner l'ARN, soit avec du glycogène 40 µg/ml ou de l'ARNt 10 µg/ml, soit par l'intermédiaire d'une résine, le RNABIND (Eurobio, France). Dans la première procédure, après élimination du surnageant, l'ARN est ensuite lavé 2 fois avec l'éthanol 75% et séché sous vide. Dans le cas où on utilise la résine, l'ARN est élué dans un petit volume d'eau stérile "RNase free" et utilisé directement dans la RT-PCR.

e. Synthèse d'ADN complémentaire par réverse transcription

Environ 0,1 à 0,5 µg d'ARN sont traités à 65°C pendant 5 minutes, et le cDNA est synthétisé à 42°C pendant 1 heure en présence de l'AMV Reverse Transcriptase (Invitrogen, UK), 1 µg d'hexamères au hasard comme amorces, et des désoxynucléotides dans un volume réactionnel de 20 µl, selon les indications du fournisseur. Dix unités de l'inhibiteur de la RNase, le RNAsin (Invitrogen, UK) sont ajoutés à la réaction pour éviter toute contamination.

3. Préparation des acides nucléiques des standards

a. Préparation des cellules 8E5

Cette lignée est entretenue dans le milieu RPMI supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (SVF) et d'antibiotiques.

Les PCR sont réalisées directement sur les cellules 8E5 lysées selon une méthodologie simplifiée: un aliquote de culture est mélangé avec 100 µl de solution de lyse (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; NaCl 10 mM; MgCl₂ 5 mM; Triton X100 1% v/v), et traité à 65°C avec la protéinase K (200 µg/ml) pendant 1 heure, suivi d'une inactivation de la protéinase K à 95°C pendant 5 minutes. Après mélange et centrifugation à 12000 rpm pendant 1 minute, le surnageant est utilisé directement comme matrice dans les réactions de PCR.

b. Préparation de l'ADN plasmidique

*** Préparation des cellules DH5 α F'IQ compétentes**

La souche DH5 α F'IQ d'*E. coli* (Gibco) a été utilisée.

A partir d'une préculture, on ensemence au 1/100^{ème} 1 litre de milieu LB, laissé sous agitation à 37°C jusqu'à croissance semi-logarithmique.

Les bactéries sont centrifugées à 7000 g pendant 2 minutes. Le culot cellulaire est resuspendu dans un demi volume de CaCl₂ 100 mM froid et laissé pendant 20 minutes dans la glace. Les cellules sont ensuite centrifugées à la même vitesse, et resuspendues dans 1/20^e de CaCl₂ 100 mM (v/v). Les cellules rendues ainsi compétentes peuvent être utilisées pour la transformation.

*** Transformation des cellules compétentes**

Le protocole utilisé est celui décrit par Maniatis et coll., (1982).

Deux cents nanogrammes d'ADN plasmidique sont ajoutés à 300 μ l de cellules compétentes, et l'ensemble est laissé dans la glace pendant une heure.

Après un choc thermique qui favorisera la pénétration des plasmides dans les cellules, l'ensemble est mis en culture pendant une heure à 37°C, puis coulé sur gélose et mis en étuve pendant la nuit.

*** Minipréparation de l'ADN plasmique**

Cette technique a pour but de fournir rapidement, à partir des bactéries *E. coli* transformées, un ADN plasmidique pur.

Les colonies de transformants sont mises en culture de manière individuelle. A la phase stationnaire, la culture est centrifugée à 10000 g pendant 1 minute.

Le culot de bactéries subit des traitements successifs destinés à casser les cellules pour libérer l'ADN plasmidique, qui est alors précipité à l'acétate de potassium 300 mM pH 4,8 puis lavé à l'éthanol. Après séchage, l'ADN est repris dans 50 μ l de Tris-HCl 5 mM pH 8.

c. Transcription

L'ADN plasmidique linéarisé est transcrit en ARN par la T7 RNA polymérase, dans un tampon de transcription fourni avec le KIT "Riboprobe^R *in vitro* Transcription Systems", selon le protocole indiqué par le fournisseur (Promega, Madison, WI).

L'ADN résiduel est ensuite éliminé par digestion avec la "RNase free DNase" (RQ1, Promega).

4. Conditions de la PCR

Les réactions de polymérisation en chaîne s'effectuent dans un appareil PHC3 (Techné), en présence de 20 picomoles de chaque amorce, 0,2 mM final de chaque dNTP, 2 unités de Taq Polymérase (Proméga), 1,5 mM de MgCl₂, dans un volume de 50 μ l. Les conditions de la PCR sont: dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, hybridation à 56°C pendant 1 minute, extension à 72°C pendant 1 minute. Ce cycle de températures est répété 30 fois; la première dénaturation est portée à 5 minutes, et l'extension finale à 10 minutes.

5. Mesure des signaux PCR et dosage des ADNs

Dans la plupart des cas, avant son utilisation, l'ARN ou l'ADN est dosé par spectrophotométrie (DU 70, Beckman). Un spectre UV est réalisé par balayage des longueurs d'onde de 240 nm à 300 nm. Pour doser les acides nucléiques, la lecture de la densité optique (DO) s'effectue à la longueur d'onde d'absorption maximale des acides nucléiques, soit 260 nm. La concentration se calcule en utilisant la relation suivante: 1 unité de DO₂₆₀ = 40 μ g/ml d'ARN et 50 μ g/ml d'ADN.

La mesure des signaux de PCR se fait par densitométrie au spectrophotomètre, par balayage à 540 nm à partir d'un négatif photo. L'appareil scanne les différentes bandes PCR correspondant à chaque point et donne un pic d'absorbance pour chacun.

Les différentes étapes de la procédure pour la quantification virale par compétition sont illustrées sur la Figure 2.

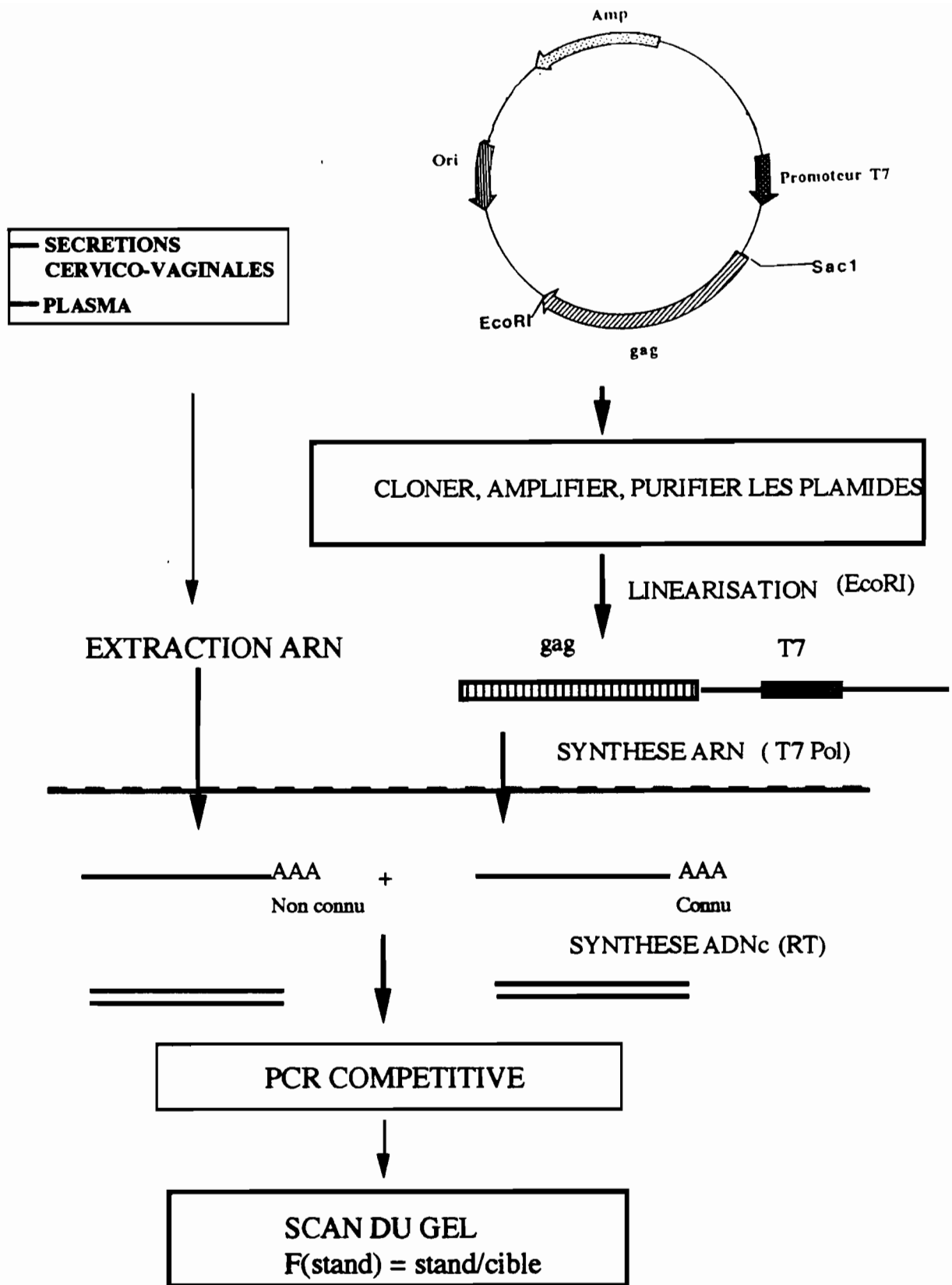


Figure 2. Représentation schématique de la procédure de quantification virale par PCR

C. Mises au point de la méthode

1. Choix des amorces

De manière générale, l'amplification pour la détection du VIH est réalisée avec les amorces SK38/SK39 situées dans le gène *gag*, qui donnent un produit de 180 paires de bases. L'oligonucléotide SK39 est très conservé dans les différents sous-types du VIH.

Pour la quantification du VIH, Piatak a développé 2 systèmes plasmidiques qui utilisent les amorces gag06/gag04, donnant des produits PCR de 260 et 180 paires de bases (Piatak et coll., 1993). L'oligonucléotide gag06 contient plusieurs résidus inosine et, de ce fait, peut s'hybrider sur des séquences *gag* de différents sous-types HIV-1.

Nous avons donc combiné les amorces gag06 et SK39, de manière à pouvoir travailler avec des échantillons provenant d'Afrique, et dont on ignore le génotype.

D'autre part, la PCR gag06/SK39 donne un produit de 400 paires de bases, ce qui présente 2 avantages majeurs :

(i) Il est fondamental que l'amplification du standard et de l'échantillon se fasse avec la même efficacité. Or la quantification par compétition utilise 2 produits dont la différence de taille est de 80 paires de bases. Cette différence représente 30% d'un produit de 260 paires de bases, et 20% d'un produit de 400 paires de bases. Malgré l'application d'un facteur de correction de taille, il est préférable d'amplifier le fragment de 400 paires de bases.

(ii) Dans les sécrétions cervico-vaginales, il se peut que la charge virale soit faible. Nous appliquons par conséquent 30 cycles de PCR aux échantillons afin de pouvoir visualiser le produit d'amplification. Ces mêmes conditions, obligatoirement appliquées au standard, sont rapidement saturantes pour un fragment de faible taille malgré la gamme de dilutions. L'utilisation d'un produit de taille plus importante est fondamentale pour respecter le principe de linéarité d'une quantification.

2. Vérification des contrôles

a. Standards plasmidiques

*** Gamme du standard pQPΔ80**

Une série de dilutions de 1 à 10^4 copies du plasmide pQPΔ80 est soumise à une réaction de PCR, comme indiqué plus haut (Matériels et Méthodes). Après migration sur gel d'agarose et photographie, le négatif photo est scanné à 540 nm dans un spectrophotomètre. La Figure 3a représente l'absorbance obtenue pour chaque dilution en fonction du nombre de copies du plasmide.

Une droite de régression de pente 1 a été obtenue.

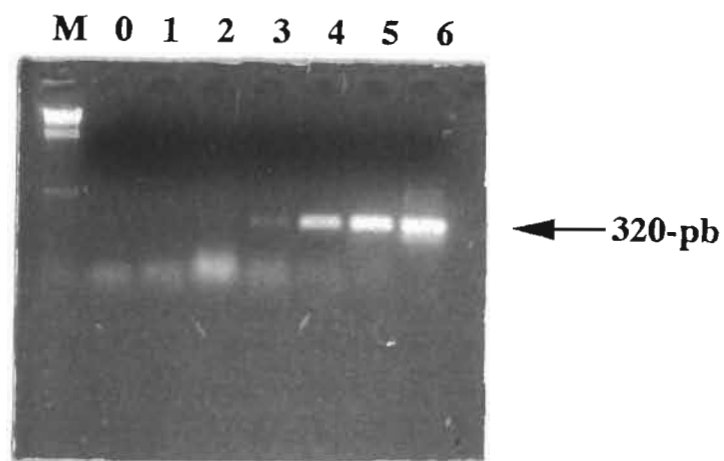
Nous ne remarquons pas de signal PCR avant la dilution correspondante à 5-10 copies.

*** PCR compétitive entre pQPΔ80 et pQP1**

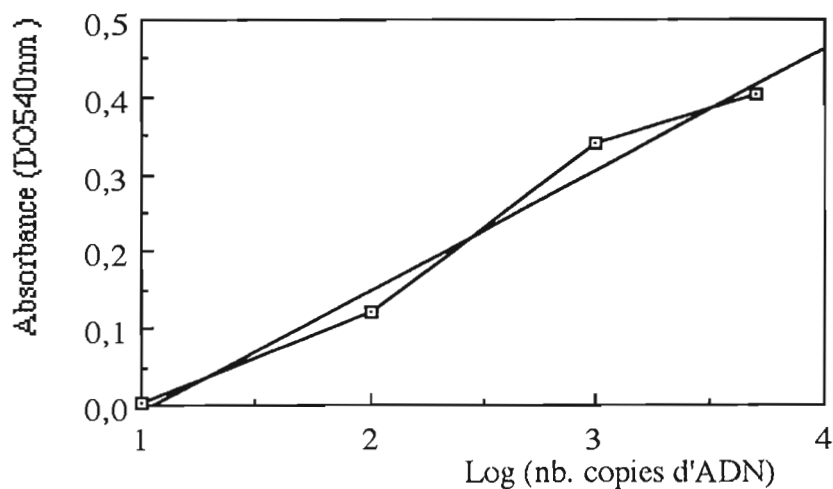
Une même quantité de plasmide pQP1 (10 copies) est ajoutée à la gamme précédemment définie pour pQPΔ80.

La photographie du gel nous permet de constater une variation inversée de l'intensité des signaux entre le fragment du standard (pQPΔ80) et le fragment cible (ici pQP1).

La Figure 3b représente le rapport des absorbances standard/cible pour chaque dilution de standard, en fonction du nombre de copies.



A

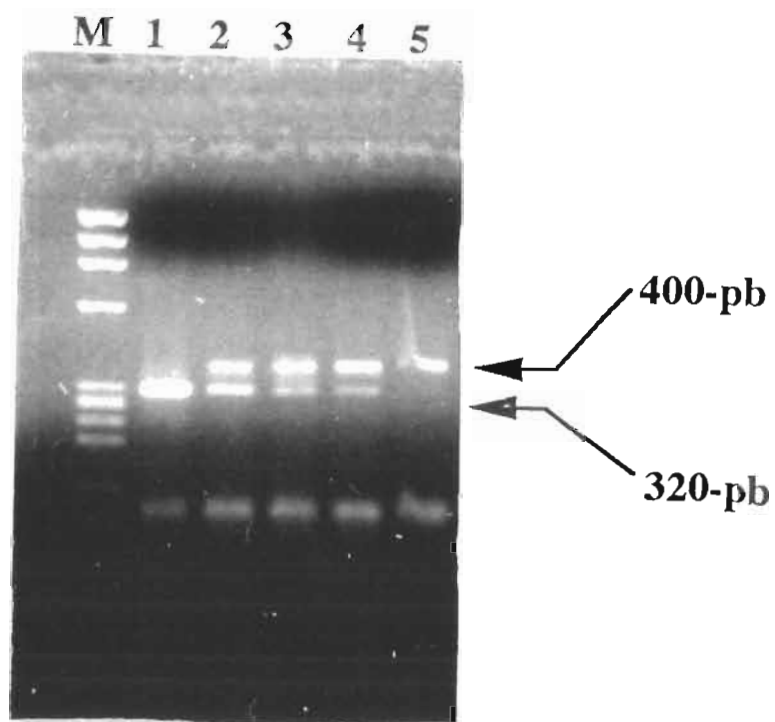


B

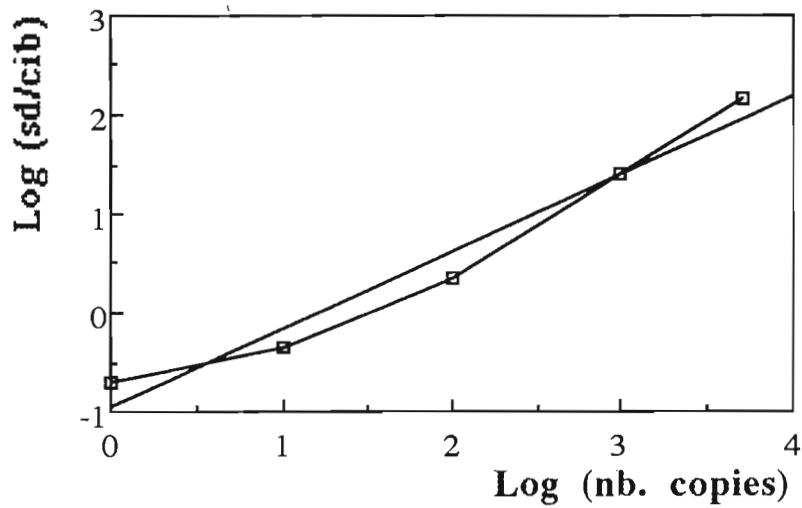
Figure 3a : Gamme du standard pQPΔ80

(A) Profils PCR en gel d'agarose 1,2% des dilutions de pQPΔ80. M: 1 Hind III
 0: témoin négatif (H₂O); 1: zéro copie; 2: 1 copie; 3: 10¹ copies; 4: 10² copies 5: 10³
 copies; 6: 10⁴ copies.

(B) Variation d'absorbance en fonction du nombre de copies



A



B

Figure 3b : PCR compétitive entre pQPΔ80 et pQP1

(A) Profils PCR en gel d'agarose 1,2% avec 10 copies de PQP1 (cible) et différentes dilutions de pQPΔ80 (standard). Marqueur: ΦX174/HaeIII; 1: 10^4 copies; 2: 10^3 copies; 3: 10^2 copies; 4: 10^1 copies; 5: 1 copie.

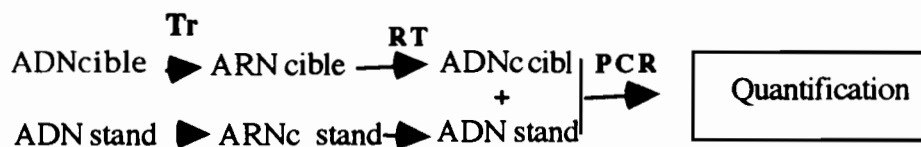
(B) Variation du rapport des absorbances en fonction du nombre de copies de standard.

* RT-PCR quantitative

Dans la mesure où la quantification du VIH dans le plasma et les sécrétions génitales s'effectuera sur l'ARN, nous avons réalisé une transcription des ADN plasmidiques en ARN. Ces ARNs sont quantifiés et une série de dilutions de 1 à 10000 copies est réalisée. Une même quantité d'ARN du plasmide pQP1 (10 copies), considéré comme la cible, est ajoutée à une gamme de dilutions d'ARN de pQPΔ80.

Les ARNs sont alors rétrotranscrits en ADN complémentaire avec la reverse transcriptase puis amplifiés de manière compétitive par PCR. Les produits de la PCR sont analysés comme indiqué précédemment.

Le principe de la méthode est illustré par le schéma suivant, et les résultats obtenus sont reportés sur la Figure 4a.



Nous avons également testé une alternative qui consiste à quantifier l'ARN, transformé au préalable en ADN complémentaire, en utilisant la gamme pQPΔ80 (ADN) précédemment définie. Le but est de vérifier si nous obtenons des résultats cohérents dans le cas où les conditions de manipulation ne permettraient pas de disposer d'une gamme d'ARN.

Les résultats obtenus sont illustrés sur la Figure 4b.

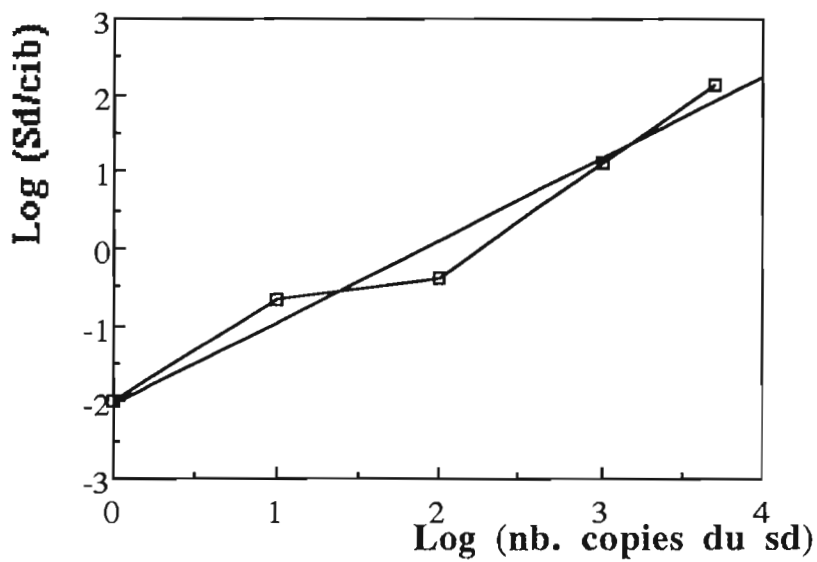
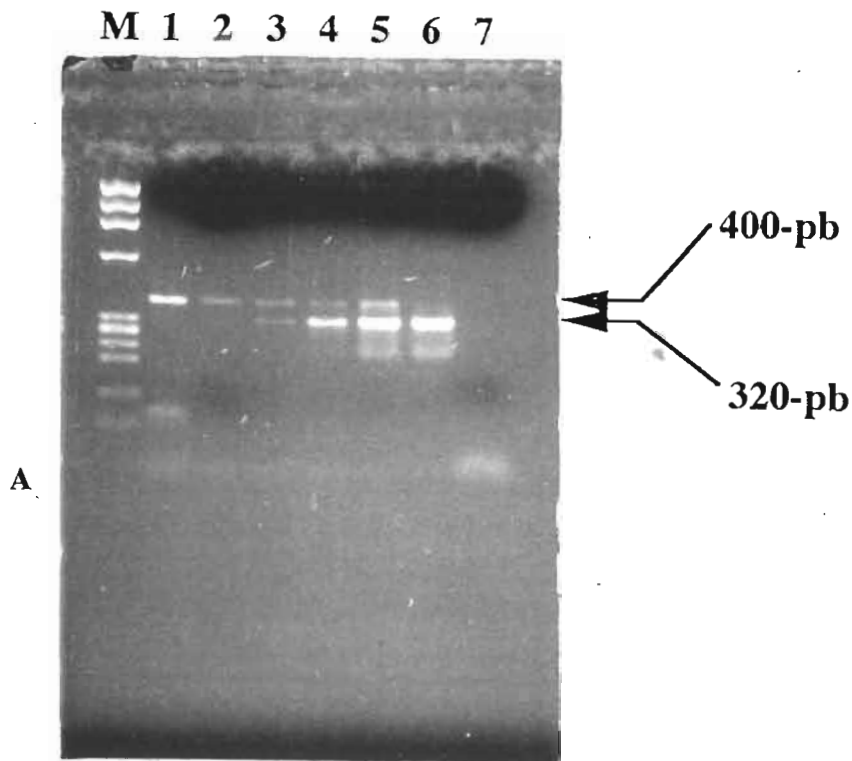


Figure 4a : RT-PCR quantitative par compétition

(A) Profils RT-PCR compétitive avec 10 copies d'ARN de PQP1(cible) et des dilutions d'ARN de pQPΔ80 (Standard). M: ΦX174/HaeIII; 1: zéro copie (c); 2: 1c; 3: 10^1c ; 4: 10^2c ; 5: 10^3c ; 6: 10^4c de QPΔ80, 7: témoin négatif (H₂O).

(B) Variation du rapport des absorbances en fonction de nombre de copies

b. Standard cellulaire (cellules LAV-8E5)

*** Gamme du standard**

Nous avons réalisé une série de dilutions limites des cellules 8E5, puis nous avons repris chaque dilution dans un tampon de lyse, avant de réaliser la PCR directement sur cellules lysées. Afin de s'assurer de la qualité des dilutions, la PCR est réalisée avec 2 séries de dilutions indépendantes. La gamme de dilutions couvre 1 à 10^4 cellules.

Nous avons obtenu une droite de régression, représentée avec les résultats obtenus sur la Figure 5a.

Nous remarquons que le point correspondant à une copie ne donne pas de signal visible par notre méthode.

*** Analyse de l'effet du nombre de PBMCs**

La quantification du VIH intégré par l'intermédiaire des cellules 8E5 est mise au point par PCR directe sur cellules lysées. Nous avons vérifié la faisabilité de cette mesure avec des PBMCs obtenues à partir du sang de personnes non contaminées par le VIH.

5.10^4 PBMCs sont ajoutées à la gamme de dilutions des cellules 8E5. Cette quantité a été choisie au regard du très faible nombre de cellules que l'on recueille chez un patient sidéen.

Les résultats de cette expérience sont portés sur la Figure 5b.

Nous constatons que 10 copies de virus peuvent être détectées dans une réaction PCR contenant jusqu'à 5.10^4 cellules.

*** PCR non compétitive**

Nous avons réalisé une quantification non compétitive du plasmide pQP1 (10 copies), pris comme échantillon, avec la même gamme de cellules 8E5.

Les résultats de cette quantification sont donnés sur la Figure 5c.

Nous constatons que la quantification de pQP1 est surestimée de 10 fois.

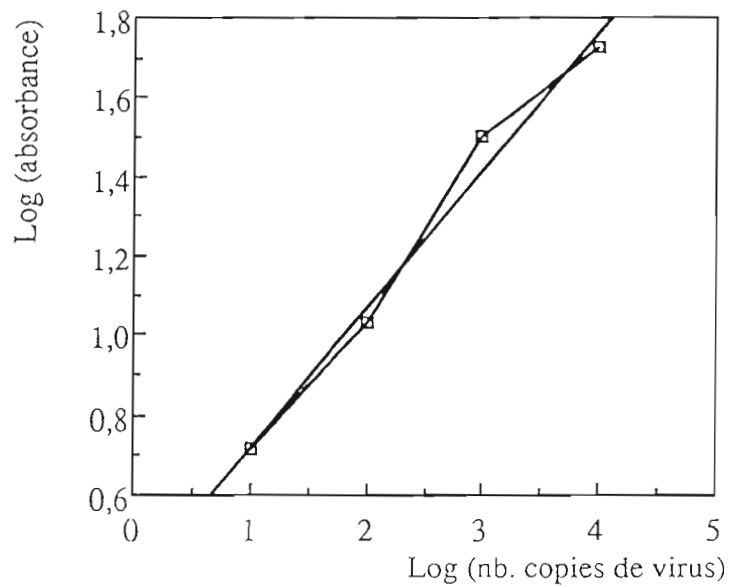
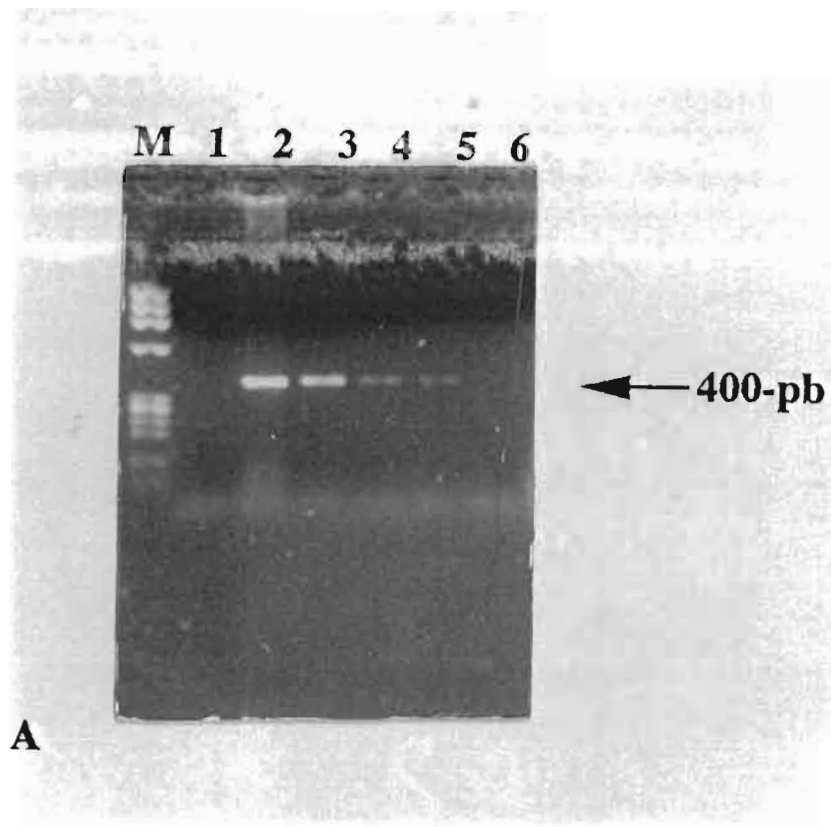


Figure 5a : Gamme du standard 8E5

(A) Profils PCR en gel d'agarose de la gamme de cellules 8E5. Marqueur: Φ X174/HaeIII; 1 : 10^4 copies; 2: 10^3 copies; 3: 10^2 copies; 4: 10^1 copies; 5: 1 copie.

(B) Variation d'absorbance en fonction du nombre de copies

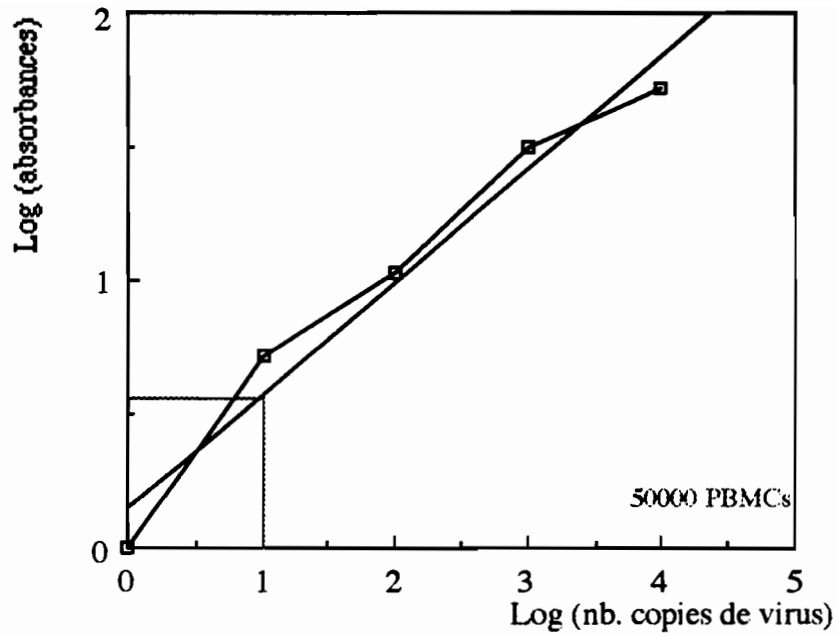


Figure 5b : Quantification avec le standard cellules 8E5 en présence de PBMCs saines

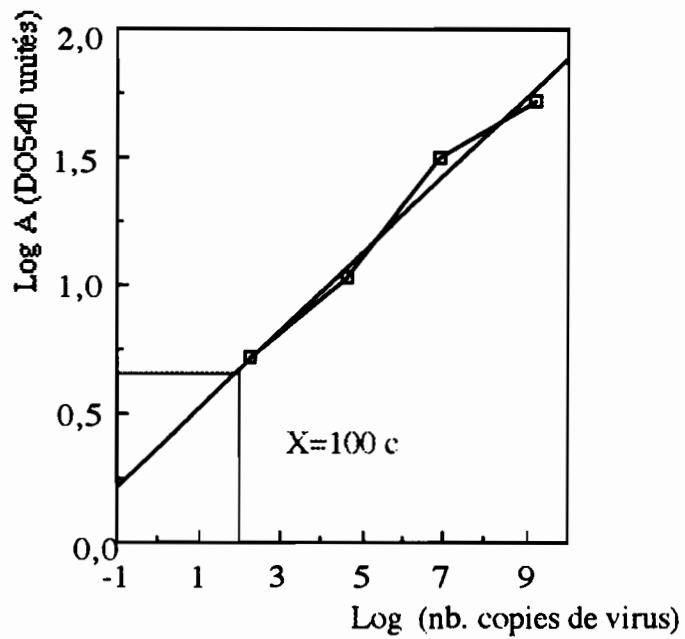


Figure 5c: Quantification de pQP1 pris comme échantillon avec les cellules 8E5

3. Discussion

Parmi les méthodes de quantification d'ADN que nous avons analysées, la PCR compétitive est la plus sensible. L'utilisation d'un standard permet de contrôler, avec une grande efficacité, les différents niveaux de la PCR et de s'affranchir des variations inter essais. Nous pouvons détecter environ 5 copies de virus contre 10 copies pour la PCR non compétitive. Cette méthode est utilisable pour la quantification d'ARN par RT-PCR sur du plasma, rendant possible le suivi de patients soumis aux traitements antirétroviraux.

Certains paramètres sont importants dans l'optimisation de la technique RT-PCR. Il s'agit de la qualité de l'ARN extrait et de l'ADN complémentaire synthétisé, en plus des paramètres de la PCR. L'efficacité et la reproductivité de la RT-PCR dépendent de la qualité et de l'intégrité de la préparation de l'ARN viral.

Pour l'extraction de l'ARN, nous avons utilisé la méthode adaptée de la technique au thiocyanate de guanidinium, après avoir récolté les particules par ultracentrifugation de sérum contaminé. La présence d'ADN cellulaire contaminant peut générer des résultats faussement positifs lors de l'amplification. Pour contourner ce problème, le sérum est clarifié par faible centrifugation pour éliminer les traces de cellules restantes. Dans le cas des ADNs résiduels provenant du plasmide standard, pendant la synthèse d'ARN, les transcrits sont traités à la DNase puis purifiés.

La qualité de l'ADN complémentaire synthétisé dépend de l'intégrité de l'ARN mais aussi de l'efficacité et de la fidélité avec laquelle cet ARN est transformé en ADNc. Une étude préliminaire nous a permis de voir que le rendement de la rétro-transcription dépendait de l'amorce et de l'enzyme utilisées. Dans cette étude, nous avons utilisé, avec une grande efficacité, des amorces au hasard ("random hexameric primers") pour transformer les transcrits viraux en ADN complémentaire. L'utilisation de l'oligo(dT), amorce des ARN messagers, ne permettrait pas d'obtenir tout le matériel de départ.

Pour ce qui concerne les enzymes, les deux principales enzymes utilisées sont l'AMV (isolée à partir de rétrovirus aviaires AMV) et la M-MuLV (isolée à partir de

rétrovirus murins M-MuLV). Ici nous avons choisi d'utiliser l'AMV qui n'est pas gênée par les structures secondaires de l'ARN.

Les composantes chimiques de la réaction de PCR peuvent affecter profondément l'activité enzymatique. C'est pourquoi nous avons été amenés à tester les conditions optimales d'amplification des transcrits, indiquées dans le chapitre précédent.

Le choix d'une méthode d'analyse n'est pas seulement lié à sa sensibilité et sa précision, mais aussi et surtout au coût, à la facilité de mise en oeuvre, ainsi qu'à la possibilité d'automatisation. Pour quantifier les produits de PCR, la méthode la plus simple consiste à analyser les absorbances des bandes obtenues par densitométrie dans un spectrophotomètre. Cette méthode est facile à transférer dans un laboratoire modeste et ne nécessite pas la mise en place des conditions de sécurité nécessaires pour l'utilisation de produits radioactifs. Elle présente l'inconvénient d'être moins sensible avec un seuil de détection de 1 ng par rapport au marquage radioactif qui a un seuil de détection de 0,1 ng. D'autres systèmes de détection sont aussi très sensibles, comme la détection par fluorescence, qui utilise des amorces de PCR comportant des fluorophores. Il est également possible de scanner les signaux obtenus sur gel d'agarose ou sur photographie par des systèmes analyseurs d'image.

Les méthodes récentes de mesure directe du virus (Chiron), ou NASBA sont très séduisantes car elles évitent les problèmes liés à la mise au point de la quantification. Un autre avantage est leur automatisation, facteur important lors d'une utilisation en clinique. Mais elles restent encore d'un coût extrêmement élevé. Néanmoins, elles sont proposées en évaluation pour être méthodes de référence dans les protocoles thérapeutiques. Cependant, elles sont nettement moins sensibles que la RT-PCR (Lin et coll., 1994) et, de ce fait, d'un intérêt limité pour des mesures de charges virales faibles, en particulier dans les sécrétions.

Conclusion Chapitre II (I)

Mise au point des méthodes de quantification relative de la charge virale

(i) Pour évaluer la charge virale chez des patients infectés avec différentes souches du virus VIH, nous avons mis au point des méthodes de quantification applicables au plasma et aux prélèvements cervico-vaginaux (cellules et surnageants de prélèvement). Les quantités relatives d'ADN ou d'ARN sont estimées par densitométrie sur un spectrophotomètre, ce qui pourrait faciliter le transfert de cette méthode dans les pays en développement.

(ii) La première méthode est basée sur le principe de la PCR compétitive ou QC-PCR (Piatak et coll., 1993), au cours de laquelle la cible à déterminer et la cible compétitrice sont co-amplifiées simultanément. Cette méthode très sensible a permis de détecter au minimum 10 copies du virus dans les liquides biologiques étudiés. Elle paraît bien adaptée aux études destinées à des évaluations précises des variations de la charge virale.

(iii) La deuxième méthode est une PCR non compétitive basée sur l'utilisation d'une gamme d'un standard: cellules lymphoïdes 8E5 (NIH, USA) contenant une copie du VIH par cellule, ou plasmide pQP1 (Piatak et coll., 1993), contenant une copie du gène à amplifier. Cette méthode, moins précise que la précédente, mais suffisamment informative, est relativement simple à mettre en oeuvre. Elle pourrait par conséquent être utilisée pour des études épidémiologiques à plus grande échelle.

II. Application à l'analyse de l'influence des MST sur la contagiosité du VIH

A. Introduction

Nous avons développé dans les chapitres précédents des méthodes de détection sensibles et spécifiques des principaux agents responsables des MST. Nous avons utilisé ces techniques dans le cadre d'une étude sur le portage cervico-vaginal du VIH et la présence des MST.

B. Matériel et méthodes

Cette étude a porté sur des prostituées séropositives à haut risque MST, suivies à l'Institut d'Hygiène Sociale (Dakar, Sénégal) et des consultantes sans risque particulier suivies au Centre de Santé Maternelle (Libreville, Gabon).

Les examens cliniques réalisés sur le terrain comprennent un questionnaire standardisé sur les antécédents médicaux ainsi que des observations cliniques pendant les examens gynécologiques.

Six cents femmes (dont 200 testées par le LiPA 1) ont été ainsi testées en ELISA VIH-1 et -2 et Western blot. Parmi elles, 13 se sont avérées VIH-positives. Ces 13 personnes sont asymptomatiques.

Les prélèvements cervico-vaginaux effectués sont utilisés pour la recherche des MST par des tests ELISA (Syva), par culture et par examen d'une lame au microscope

La recherche d'ADN proviral et d'ARN VIH-1 par PCR dans le sang et dans les prélèvements génitaux ainsi que la recherche des ADNs des agents de MST par le LiPA n°2 et par PCR, dans les prélèvements cervico-vaginaux, sont effectuées au Laboratoire Rétrovirus à Montpellier.

C. Résultats et discussion

1. Détection de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* et *T. vaginalis* dans les lavages et prélèvements cervico-vaginaux

Les prélèvements vaginaux des personnes séropositives ont été traités comme indiqué dans les Matériels et Méthodes du Chapitre II. Le lysat est utilisé directement dans la PCR et le LiPA n° 2 avec les amorces précédemment définies.

Les résultats obtenus à partir de 400 prélèvements du Gabon et du Sénégal, avec la deuxième génération de LiPA, donnent des taux de positifs de 9,8% pour *N. gonorrhoeae* et 10,3% pour *C. trachomatis*, avec une fréquence d'association de 2% pour ces deux agents.

Les résultats de la PCR et du LiPA sur les prélèvements des 13 personnes infectées par le VIH sont donnés dans le tableau 1. Parmi les 13 personnes séropositives sur les 600 étudiées, 7 sont positives pour *Neisseria gonorrhoeae*, et 6 pour *Chlamydia trachomatis* en LiPA. 7 patientes donnent des PCR positives pour *T. vaginalis*.

Parmi les 7 prélèvements cervico-vaginaux recueillis par écouvillonnage au Gabon, 2 sont positifs en LiPA pour *N. gonorrhoeae* et 5 pour *C. trachomatis*. Nous avons trouvé un seul cas d'infection par *T. vaginalis* en PCR, qui correspond à une triple infection. Globalement, l'infection prépondérante est une infection à *Chlamydia* (5 cas sur 6); elle est associée à une infection à *Neisseria* dans 1/3 des cas.

Parmi les 6 prélèvements par lavage cervico-vaginal chez les prostituées de Dakar, nous avons trouvé 5 cas d'infection à *N. gonorrhoeae* et 1 cas pour *C. trachomatis*. En revanche, ces prostituées sont toutes positives en PCR pour *T. vaginalis*, qui est donc l'infection majoritaire dans cette série limitée. Elle est associée de manière très importante (plus de 3/4 des cas) à une infection à *Neisseria*. Le cas détecté d'infection à *Chlamydia* correspond à une triple infection.

Globalement, dans cette étude, les cas d'infection simultanée par 2 ou 3 MST sont souvent observés.

Il est toutefois important de signaler qu'aucun signe clinique d'ulcération macroscopique n'a été observé.

2. Détection du virus et charge virale

Les individus co-infectés MST/VIH ont fait l'objet d'une détection génomique et d'une mesure relative de la charge virale du VIH, soit dans leur plasma, soit dans leurs prélèvements cervico-vaginaux (écouvillonnage ou lavage).

a. Détection du VIH dans les sécrétions et dans le plasma

En ce qui concerne la détection dans le plasma, nous avons extrait les ARNs qui nous ont servi de matrice dans les réactions de RT-PCR.

Tous les prélèvements du Sénégal et du Gabon positifs en ELISA sont positifs en RT-PCR avec le couple d'amorces gag06/SK39.

Les lavages cervico-vaginaux sont effectués dans 4 ml de tampon PBS et les prélèvements par écouvillonnage sont conservés dans 1 ml de sérum physiologique.

Après clarification par centrifugation sur ces 2 types de prélèvements, l'ARN viral est extrait à partir du surnageant et l'ADN des cellules est extrait à partir du culot.

On réalise alors une PCR sur l'ADN cellulaire pour détecter le provirus intégré, et une RT-PCR sur l'ARN pour détecter le virus libre évoluant dans les sécrétions génitales.

Parmi les 13 prélèvements étudiés, 10 ont été trouvés positifs.

Les prélèvements vaginaux dans lesquels on ne détecte pas de virus libre (I 17G et I 87G), correspondent à des patientes dont la charge virale du VIH dans le plasma est faible (0), par comparaison avec les autres cas (tableau 1 B).

TABLEAU : Résultats de l'étude préliminaire de la contagiosité sexuelle sur les sécrétions cervico-vaginales des prostituées de Dakar (A) et des consultantes d'un centre de soin de Libreville (B).

Patients	LiPA/PCR			Sérologie VIH		PCR VIH	RT-PCR VIH	Charge provirale	
	UG	MST (NU)		1	2	Lv	Pl	Lv	
		CT	NG			TV			
1001S	-	-	+	+	+	-	+	+	++
1002S	-	-	+	+	+	-	+	+	++
1003S	-	-	-	+	+	-	-	+	-
2001S	-	-	+	+	+	-	+	+	++
2002S	-	-	+	+	+	-	+	+	+
2003S	-	+	+	+	+	-	+	+	+++

A

Patients	LiPA/PCR			Sérologie VIH		RT-PCR VIH		Charge virale nb. copies/ ml		
	UG	MST (NU)		1	2	Pl	Pv	Pl	Pv	
		CT	NG			TV				
I 17G	-	+	+	-	+	-	+	-	1161	0
I 28G	-	+	-	-	+	-	+	+	40392	32335
I 31G	-	-	-	-	+	-	+	+	26857	<100
I 87G	-	+	+	+	+	-	+	-	2115	0
I 114G	-	+	-	-	+	-	+	+	13896	<100
I 137G	-	+	-	-	+	-	+	+	23428	928
I 147G	-	ND	ND	-	+	-	+	+	7566	113

B

(+) positif; (-) négatif; (ND) non déterminé; (NU) non-ulcérate; (UG) ulcération génitale; (Lv) lavages cervico-vaginaux; (Pv) prélèvements cervico-vaginaux; (Pl) plasma; (CT) *C. trachomatis*; (NG) *N. gonorrhoeae*; (S) Sénégal; (G) Gabon.

En ce qui concerne la détection du virus intégré dans les cellules des sécrétions génitales, effectuée chez les prostituées de Dakar, 5 prélèvements sur 6 sont positifs.

Le prélèvement dans lequel on ne détecte pas de provirus intégré correspond au seul cas d'infection simple par *T. vaginalis*. Les prélèvements positifs correspondent à des cas d'infection multiple par 2 ou 3 MST.

Les résultats de la PCR et de la RT-PCR réalisées avec les amorces gag06/SK39 sont donnés dans le tableau précédent.

b. Mesures relatives de la charge virale

*** Charge virale plasmatique**

La charge plasmatique du VIH a été évaluée par RT-PCR dans le groupe des patientes du Gabon.

Les chiffres obtenus, en copies d'ARN/ml (colonne pl), sont cohérents avec les données de la littérature concernant des patients asymptomatiques (Piatak et coll., 1993a; Dewar et coll., 1994; Scadden et coll., 1992). Toutefois, certaines personnes ont une charge virale très faible.

*** Charge virale des sécrétions**

Compte tenu des différences de volume des prélèvements (lavage ou écouvillonnage) d'un groupe à l'autre, nous donnerons une quantification relative de la charge virale dans les sécrétions, sans comparaison des chiffres entre les groupes.

En ce qui concerne la mesure de l'ARN libre des sécrétions dans le groupe du Gabon, nous obtenons une gamme assez large de chiffres, de zéro à 32300 copies/ml. L'ARN ne peut être détecté chez 2 personnes, pour lesquelles la charge virale plasmatique est la plus faible.

Dans ce groupe, nous n'observons aucune corrélation entre le niveau d'ARN libre dans les sécrétions avec l'infection ou la co-infection par les MST.

Toutefois, l'échantillonnage doit être complété avant de conclure. En particulier, des témoins HIV non infectés par des MST doivent être étudiés.

Cependant, il a été établi que la prévalence du virus libre dans les sécrétions de femmes infectées n'est pas liée au stade de la maladie SIDA, ni aux antécédents MST chez ces femmes (Hennin et coll., 1993).

*** Mesure relative du provirus intégré dans les cellules des sécrétions**

La détection et la mesure relative de l'ADN viral dans les cellules des sécrétions ont été effectuées pour le groupe des prostituées de Dakar. La détection n'a pas été possible pour le groupe des femmes du Gabon, par manque de matériel génétique dans les prélèvements par écouvillonnage.

Nous avons comparé la charge en provirus des prélèvements par l'observation des intensités des fragments PCR en gel d'agarose. Les mêmes quantités de produit ont été déposées sur le gel, et les réactions de PCR ont été effectuées à partir de la même quantité d'ADN de départ. Pour plus de commodité, nous avons reporté ces observations sous la forme d'une échelle de signes (+) dans le tableau 1A.

L'observation des intensités des bandes obtenues nous suggère que la quantité de provirus intégré semble liée à la présence de co-infection par les MST. En effet, il n'y a pas de détection dans le cas d'une infection MST simple (1003S); l'intensité la plus importante est obtenue dans le cas d'une triple infection MST (2003S), et des intensités plus faibles sont observées dans le cas d'une infection double.

Ces résultats, bien que parcellaires, sont en accord avec l'idée que l'augmentation des cellules inflammatoires au niveau cervico-vaginal, induite par les MST non-ulcératives, conduirait localement à une élévation de la concentration en provirus VIH (Zorr et coll., 1994).

Toutefois, la présence de l'ADN du VIH dans les sécrétions cervicales est significativement associée à d'autres facteurs, comme l'ectopie cervicale, l'usage de contraceptifs oraux, et l'état de grossesse (Clemetson et coll., 1993). Nous n'avons pas connaissance de ces éléments dans les groupes de femmes étudiées.

Le développement des nouvelles techniques sensibles pour mieux quantifier le virus dans les sécrétions génitales est d'une importance dans cette problématique (Laga et coll., 1994).

Conclusion Chapitre II (II)

Étude de faisabilité sur l'application des méthodes développées aux recherches sur les interactions MST/VIH

(i) - Nous avons voulu évaluer la faisabilité d'une étude des corrélations entre le statut infectieux à MST et celui à VIH, afin de déterminer les facteurs à prendre en compte dans le cadre d'une étude sur la transmission sexuelle du VIH. Sur 600 prélèvements provenant de femmes du Gabon et du Sénégal, nous avons détecté des prévalences de 21%, 7,4%, et 12,9% respectivement pour *T. vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Chlamydia trachomatis*.

(ii) - Sur les 600 prélèvements ayant fait l'objet de recherche de VIH-1 ou de VIH-2, treize ont été positifs au test ELISA, et confirmés en RT-PCR en utilisant les amorces gag06/SK39, conservées dans les différents VIH. Avec le lavage cervico-vaginal, plus homogène que l'écouvillonnage, nous avons pu amplifier des séquences virales, sous forme libre ou sous forme intégrée.

(iii) - Après avoir effectué la détection du virus par PCR, nos méthodes de quantification nous ont permis d'évaluer la charge virale relative dans le plasma ainsi que dans les surnageants et les cellules des prélèvements cervico-vaginaux.

(iv) - Notre étude a révélé un taux élevé d'infections multiples par les MST (10/13) chez les personnes séropositives analysées. Les résultats de cette étude nous permettent de considérer que la charge virale relative du VIH dans les sécrétions cervico-vaginales (provirus), peut constituer un aspect important dans l'étude des interactions VIH/MST.

(v) - Cette étude nous a servi à appréhender la faisabilité méthodologique et technique d'une étude des facteurs influençant le portage cervico-vaginal, et donc la contagiosité sexuelle du VIH, lors de co-infection avec des MST. Une étude prospective approfondie prenant en compte tous les éléments pouvant influencer la présence cervico-vaginale du virus est en cours.

Conclusions générales et perspectives

Conclusions générales et perspectives

De nombreux travaux traitant des interactions entre les maladies sexuellement transmissibles et le VIH ont été réalisés. Cependant, le rôle des MST non-ulcéraives vis-à-vis de l'infection et de la transmission sexuelle du VIH n'est pas encore élucidé.

Au cours de ce travail, nous nous sommes consacrés à des mises au point méthodologiques et à une étude de faisabilité du projet portant sur l'influence des MST sur la contagiosité sexuelle du VIH.

L'intérêt de répondre à cette question est primordial et réside sur la possibilité d'envisager des thérapeutiques prophylactiques à un moment précis contre des cofacteurs ou des facteurs de risque potentiels.

Pour mieux appréhender l'importance des MST non-ulcéraives, nous avons développé des outils de diagnostic simples, plus sensibles et plus spécifiques que les méthodes existantes. D'autre part, ces outils devraient permettre d'obtenir des profils précis de l'évolution clinique des MST chez des personnes infectées par le VIH.

La mise au point du diagnostic de *Trichomonas vaginalis* a été fondée sur une étude en profondeur du génome du parasite. Nous avons recherché les cibles potentielles parmi les séquences hautement répétées, après mise au point de la préparation d'ADN de *T. vaginalis*. La caractérisation fine de ces régions par séquençage nous a permis d'aboutir à 2 résultats importants.

Le premier résultat concerne la découverte, pour la première fois, de séquences microsatellites chez un protozoaire (*T. vaginalis*). Ceci pourrait permettre la caractérisation génétique et phylogénétique non seulement de ce parasite, mais aussi d'autres espèces de parasites. Les marqueurs fins, comme les microsatellites, pourraient servir à reconstituer les itinéraires de contamination par les agents infectieux. Ces possibilités n'ont pas fait l'objet du travail présenté ici.

Le second résultat concerne la possibilité de désigner des amorces spécifiques pour la détection de *T. vaginalis*. De cette manière, le diagnostic se trouve considérablement amélioré par rapport aux méthodes d'observation microscopique. Au cours d'études postérieures, nous avons pu détecter de nombreux cas qui n'étaient pas détectables auparavant. D'autre part, la rapidité de cette méthode, par rapport à la mise en culture, donne un diagnostic précoce qui permet d'intervenir rapidement chez les patients. Ce travail a fait l'objet d'une publication (n° 1).

Cette méthode de détection permettra d'assurer les connaissances en matière d'épidémiologie, de diagnostiquer des cas asymptomatiques, et de suivre non seulement l'évolution de l'infection et/ou de la co-infection avec le VIH, mais encore l'efficacité des traitements prophylactiques.

Cette mise au point nous a encouragé à améliorer encore le diagnostic des MST. Ainsi, nous avons tenté d'obtenir un diagnostic simultané des 3 MST non-ulcératives les plus importantes, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, et *Trichomonas vaginalis*. De plus, nous avons intégré les exigences suivantes: spécificité, sensibilité, rapidité, simplicité.

En partenariat avec Innogenetics (Belgique), nous avons évalué une méthode basée sur une PCR multiplex et une hybridation non-radioactive des produits de la PCR avec plusieurs sondes, préalablement fixées sur une membrane. Cette méthode s'appelle "Line Probe Assay", ou LiPA.

Un travail effectué sur plusieurs centaines de prélèvements (600) provenant de femmes à risque et de femmes enceintes du Sénégal et du Gabon a permis de démontrer la faisabilité de la méthode. Cette technique a permis d'obtenir des résultats significativement plus sensibles que par les méthodes classiques. D'autre part, elle autorise le traitement simultané d'une centaine d'échantillons, pour lesquels on obtient un résultat plus rapide. Ce travail a fait l'objet d'une publication (n°2) à soumettre.

En conclusion, nous avons développé, pour la première fois par PCR, une détection simultanée de trois agents de maladies sexuellement transmissibles.

Le LiPA, dont la fiabilité a été démontrée sur 600 échantillons pour *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae*, est un produit à visée commerciale.

La prochaine génération de LiPA, sur laquelle nous travaillons, comporterait également des sondes spécifiques de *T. vaginalis*, afin de couvrir la gamme des principales maladies sexuellement transmissibles non-ulcératives.

Les études épidémiologiques ont démontré que les maladies sexuellement transmissibles sont un des facteurs influençant la transmission sexuelle du VIH (Laga et coll., 1993). Compte tenu de notre objectif de rechercher les liens pouvant exister entre la transmission sexuelle du VIH et l'infection par les MST inflammatoires, nous avons été amenés à évaluer la présence du VIH dans les sécrétions génitales chez des personnes co-infectées. En dehors de la réponse immunitaire de l'hôte, qui ne fait pas l'objet de notre travail, la présence du virus dans l'aire génitale peut être aussi bien liée aux infections locales qu'à la charge virale.

Par conséquent, nous avons mis au point une méthode de quantification du virus libre par RT-PCR, adaptée de la QC-PCR développée par Piatak et coll., (1993), et une méthode de quantification du virus intégré. Chacune de ces méthodes comporte deux alternatives, selon que l'on réalise la PCR par compétition ou non. Les références VIH utilisées pour cette mise au point sont soit des standards plasmidiques comportant des séquences virales à des concentrations connues (Piatak et coll., 1993), soit les cellules LAV-8E5 comportant une copie de virus par cellule (NIH, USA). Ces alternatives sont équivalentes pour ce qui concerne la sensibilité, à la fois sur du plasma et sur des PBMCs de patients séropositifs.

Nous avons appliqué notre méthodologie à la quantification du VIH dans les sécrétions cervico-vaginales de patientes co-infectées par le virus et une ou plusieurs MST. Ce travail, effectué à partir des 600 prélèvements sur lesquels un diagnostic MST avait été réalisé, a permis de montrer que seulement 13 patientes sont co-infectées VIH/MST. D'autre part, il a été possible d'évaluer la charge virale relative dans le plasma et les sécrétions génitales, chaque fois que nous avons pu disposer de

prélèvements effectués et transmis dans de bonnes conditions (écouvillonnage et lavage cervico-vaginal avec 5 ml de PBS, congelé à - 80°C). Par ailleurs, nous avons mis en évidence non seulement des séquences virales libres dans les fluides cervico-vaginaux, mais aussi des séquences virales intégrées dans les cellules des sécrétions cervico-vaginales. Il ressort de notre analyse que, dans les sécrétions cervico-vaginales des personnes co-infectées, les séquences virales sont détectées très facilement, par comparaison avec ce qui a été publié sur des personnes séropositives mais non infectées par des MST (Hénin et coll., 1993). Ces séquences virales sont obtenues dans la grande majorité des cas observés, et dans des proportions variables.

Cette étude préliminaire réaffirme la réalité d'une association entre le VIH et les MST non-ulcéraives, et préfigure une analyse plus approfondie, qui devra prendre en compte tous les éléments pouvant influencer la contagiosité sexuelle. L'identification de ces facteurs est importante dans la mesure où cela peut permettre de définir des stratégies optimales pour la prévention de la transmission sexuelle du VIH.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Alderete J.F., Arroyo R., Dailey D.C., Engbring J., Khoshnan M.A., Lehker W.M. & McKay J.** Molecular analysis of *Trichomonas vaginalis* surface protein repertoires. *Mol. Cell. Biol. Hum. Dis. Ser.*, 1992, 1: 173-202.
- Alderete J.F., Kasmala L., Metcalfe E.C. & Garza G.E.** Phenotypic variation and diversity among *Trichomonas vaginalis* and correlation of phenotype with contact-dependent host cell cytotoxicity. *Infect. Immun.*, 1986, 53: 285-293.
- Alderete J.F., Lehker M.W. & Arroyo R.** The mechanisms and molecules involved in cytoadherence and pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol. Today*, 1995, 11: 70-74.
- Alexander N.J.** Sexual transmission of human immunodeficiency virus entry into the male and female genital tract. *Fertil. Steril.*, 1990, 54: 1-18.
- Anderson D.J., O'Brien T.R., J.A.P., Martinez A., Seage G.R., Padian N., Horsburgh R.C. & Mayer K.H.** Effects of disease stage and zidovudine therapy on the detection of human immunodeficiency virus type-1 in semen. *J. Am. Med. Ass.*, 1992, 267: 2769-2774.
- Anderson D.J., Wolff H., Pudney J., Wenhao Z., Martinez A. & Mayer K.** Presence of HIV in semen: In Alexander N.J., Gablenick H.L. and Spieler J.M., ed. Heterosexual transmission of AIDS, New York Wiley-Liss, 1990, 167-180.
- Arya O.P. & Lawson J.B.** Sexually transmitted diseases in the tropics. Epidemiological, Diagnostic, Therapeutic, and Control Aspects. *Tropical Doct.*, 1977, 7: 51-56.
- Aucouturier P., Couder L.S., Grouet D., Danion F., Gombert J., Matheron S., Sainot A.G., Clauvel J.P. & Peud'home J.L.** Serum immunoglobulin G subclass dysbalance in the lymphadenopathy syndrome and acquired immunodeficiency syndrome. *Clin. Exp. Immunol.*, 1986, 63: 234-240.
- Bacchetti P. & Moss A.R.** Incubation period of AIDS in San Francisco. *Nature*, 1989, 338: 251-253.

- Bahat S., Mettus R.V., Reddy E.P., Ugen K.E., Srikanthan V., Williams W.V. & Weiner D.B.** The galactosylceramide/sulfatide receptor binding region of gp120 maps to amino acids. *AIDS. Res. Hum. Retrovirus*, 1993, 9:206-175.
- Barat C., Schatz O., Le Grice S. & Darlix J.L.** Analysis of the interaction of HIV-1 replication primer tRNA^{Lys} 3, with nucleocapsid protein and reverse transcriptase. *Mol. Biol.*, 1993, 231: 185-190.
- Barin F., M'Boup S., Denis F., Kanki P., Allan J.S., Lee T.H. & Essex M.** Serological evidence for virus related to simian T-lymphotropic retrovirus III in residents of West Africa. *Lancet*, 1985, II: 1387-1389.
- Barré-Sinoussi F., Chermann J.C., Rey F., Nugeyre M.T., Chamaret S., Gruest J., Dauguet C., Axler-Blin C., Vezinet-Brun F., Rouzioux C. & Montagnier L.** Isolation of a T Lymphotropic Retrovirus from Patient at Risk for Acquired Immunodeficiency Syndrome AIDS. *Science*, 1983, 200: 868
- Belsey M.A.** The epidemiology of infertility: a review with particular reference to sub-saharan Africa. *Bulletin of WHO.*, 1976, 54: 319-341.
- Benkirane M.** Role de la molécule CD4 dans le cycle de replication du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 "VIH-1". Thèse. 1994.
- Bentwich Z., Kalinkovich A. & Weisman Z.** Immune activation is a dominant factor in the pathogenesis of African AIDS. *Immunol. Today*, 1995, 16: 187-191.
- Berry N., Ariyoshi K., Jobe O., Tamba Ngum P.A., Corrah T., Wilkins A., Whittle H. & Tedder R.** HIV types 2 proviral load measured by polymerase chain reaction correlates with CD4+ lymphopenia in HIV type 2-infected individuals. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 1994, 10: 1031-1536.
- Berry N.J., Salker R., Contreras M., Barbara J.A. & Tedder R.S.** A comparison of four enzyme immunoassays for the simultaneous detection of HIV-1 and HIV-2 specific antibodies. *J. Virol. Meth.*, 1991, 34: 91-100.
- Birkenmeyer L. & Armstrong A.** Preliminary evaluation of the ligase chain reaction for specific detection of *N. gonorrhoeae*. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, 30: 3089-3094.
- Bjercke S., Scott H., Braathen L.R. & Thorsby E.** HLA-DR-expressing Langerhans-like cells in vaginal and cervical epithelium. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 1983, 62: 585-589.

- Bobo L., Munoz B., Viscidi R., Quinn T., Mkocha H. & West S.** Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* eye infection in Tanzania by polymerase chain reaction/enzyme Immunoassay. *Lancet*, 1991, 338: 847-850.
- Budhraj M., Levendoglu H., Kocha F., Mangkornkanok M. & Sherer R.** Duodenal mucosal T cell subpopulation and bacterial cultures in acquired immunodeficiency syndrome. *Am. J. Gastroenter.*, 1987, 82: 427-431.
- Buvé A., Laga M. & Piot P.** Sexually transmitted diseases. Where are we now? Health policy and planning, 1993, 8: (3) 277-281.
- Cameron W.D. & Padian S.N.** Sexual transmission of HIV and the epidemiology of other sexually transmitted diseases. *AIDS*, 1990, 4: s99-s103.
- Cao Y., Dieterich D., Thomas P.A., Huang Y., Mirabile M. & Ho D.D.** Identification and quantitation of HIV-1 in the liver of patients with AIDS. *AIDS*, 1992, 6: 65-70.
- Center for Disease Control:** Congenital syphilis in New York City. 1986-1988. *MMWr.*, 1989, 38: 825-829.
- Chapin-Robertson K.** Use of molecular diagnostics in sexually transmitted diseases. *Diagnostic Microbiol. Infect. Dis.*, 1993, 16: 173-184.
- Charmot G. & Coulaud J.P.** Role des co-facteurs infectieux dans les infections à rétrovirus en zone tropicale. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 1988, 702-706.
- Chen S.S.** Functional role of the zipper motif region of human immunodeficiency virus type-1 transmembrane protein gp41. *J. Virol.*, 1994, 68: 2002
- Chernesky M.A., Castriciano S., Sellors J., Stewart I., Cunning-Han I., Landis S., Seidelman W., Grant L., Devlin C. & Mohony J.** Detection of *Chlamydia trachomatis* antigens in urine as an alternative to swabs and cultures. *J. Infect. Dis.*, 1990, 161: 124-126.
- Chomeczynski P. & Sacchi N.** Single step of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analyt Biochem.*, 1987, 162: 156-159.
- Clark S.J., Saag M.S., Decker W.D., Campbell-Hill S., Roberson J.L., Velderkamp P.J., Kappes J.C., Hahn B.H. & Shaw G.M.** High titers of cytopathic virus in the plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *New Engl. J. Med.*, 1991, 324: 954-90.

- Clavel P.J.** West African human retroviruses related to STLV-III. *AIDS*, 1987, 1: 135-140.
- Clemetson DBA., MossGB., Willerford DM., Hensel M., Emoyi W., Holmes KK., Plummer F., Ndinya-Achola J., Roberts PL., Hillier S. & Kreiss JK.** Detection of HIV DNA in cervical and vaginal secretions. Prevalence and correlates among women in Nairobi, Kenya. *JAMA*, 1993, 269: 2860-2864.
- Clerici M. & Shearr G.M.** A TH-1/TH-2 switch is a critical step in the ethiology of HIV infection. *Immunol. Today.*, 1993, 14: 107-111.
- Cohen J.** Searching for markers on the AIDS trail. *Science*, 1992, 258: 388-390.
- Coombs R. W., Collier A.C., Allain J.P., Nikora B., Leuther M., Gjerset G.F. & Corey L.** Plasma viremia in human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.*, 1989, 321: 1626-1631.
- Coughlan B. & Skinner G.** Immunoglobulin concentrations in cervical mucus in patients with normal and abnormal cervical cytology. *British J. Obstetr. Gynec.*, 1977, 84: 429-434.
- Cox P.J. & Nicole C.S.** Growth studies of various strains of *Trichomonas vaginalis* infection. *J. Clin. Pathol.*, 1973, 41: 806-808.
- Cui Z.D., Tristram D., LaScolea L.J., Kwiatkowski T., Kopti S. & Ogra P.L.** Induction of antibody response to *Chlamydia trachomatis* in the genital tract by oral immunization. *Infect. Immun.*, 1991, 59: 1465-1469.
- Cuny G., Veas F. & Roizès G.** "Pocket-blotting": A method for transferring nucleic acids onto nylon membranes. *Anal. Biochem.*, 1990, 193: 45-48.
- Daar E.S., Chernyavskiy T., Zhao J.Q., Frogstad P., Chen I.S.Y. & Zack J.A.** Sequential determination of viral load and phenotype in human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res. & Hum. Retroviruses*, 1995, 11: 3-9.
- Dailey D.C. & Alderete J.F.** The phenotypically variable surface protein of *Trichomonas vaginalis* has a single, tandemly repeated immunodominant epitope. *Infect. Immun.*, 1991, 59: 2083-2088.
- Datta P., Laga M., Plummer F.A., Ndinya-Achocha J.O., Piot P., Maitha G., Ronald A.R. & Brunham R.C.** Infection and disease after perinatal exposure to *Chlamydia trachomatis* in Nairobi, Kenya. *J. Infect. Dis.*, 1988, 158: 524-528.

- Davies M. & Parott D.** Cytotoxic T cells in small intestine epithelium, lamina propria and lung lymphocytes. *Immunol.*, 1981, 44: 367-171.
- De Bruijn M.H.L. & Barker D.C.** Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop.*, 1992, 52: 45-58.
- Dei-Cas E., Soulez B., Palluault F., Charet P. & Camus D.** *Pneumocystis carinii*, un défi pour le biologiste. *M/S.* 6: 517-525.
- De Muylder X., Laga M., Tennstedt C., Van Dyck E., Aelbers G.N. & Piot P.** The role of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* in pelvic inflammatory disease and its sequelae in Zimbabwe. *J. Infect. Dis.*, 1990, 162: 501-505.
- De Schamphelleire I., Van de Velden L., Van Dyck E., Guindo S., Quint W. & Franssen L.** Maladies sexuellement transmissibles dans la population féminine à Pikine, Sénégal. *Ann. soc. Belge. Med. Trop.*, 1990, 70: 227-235.
- De Schryver A. & Meheus A.** Epidemiology of sexually transmitted diseases: The global picture. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 1990, 68 (5): 639-654.
- Denis F., Leonard G., Sangaré A., Gershy-Damet G., Rey J.L., Soro B., Schmidt D., Mounier M., Verdier M. & Baillou A.** Comparaison of 10 enzyme immunoassays for detection of antibody to human immunodeficiency virus type 2 in West African sera. *J. Clin. Microbiol.*, 1988, 26: 1000-1004.
- Dewar R.L., Highbarger H.C., Sarmiento M.D., Todd J.A., Vasudevachari M.B., Davey R.T., Kovacs J.A.Jr., Salman N.P., Lane H. C. & Urdea M.S.** Application of branched DNA signal amplification to monitor human immunodeficiency virus type 1 burden in human plasma. *J. Infect. Dis.*, 1994, 170: 1172-1179.
- Diamond L.S.** The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J. Parasitol.*, 1957, 43: 488-490.
- Dimmock N.** Mecanisms of neutralization of animal viruses. *J. Gen. Virol.*, 1984, 65: 1015-1022.
- Edwards J.R., Ulrich P.P., Weintrub P.S., Cowan M.J., Levy J.A., Wara D.W. & Vyas G.N.** Polymerase chain reaction compared with concurrent viral cultures for rapid identification of human immunodeficiency virus infection among high-risk infants and children. *J. Pediatr.*, 1989, 115: 200-203.

- Ellison V. & Brown P.O.** A stable complex between integrase and viral DNA ends mediates HIV integration in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91: 7316-7320.
- Erlich K., Mill J., Chapis P., Mertz G.C., Busch R.M., Follansbee S.E., Grant R.M. & Grumppacker C.S.** Aciclovir-resistant herpes simplex virus infections in patients treated with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 1989, 320: 293-296.
- Ernst P., Befus A. & Bienenstock J.** Leukocytes in the intestinal epithelium: an unusual immunological compartment. *Immunol. Today*, 1985, 6: 50-55.
- Ernst P., Clark D., Rosenthal K. & Bienenstock J.** Detection and characterization of cytotoxic T lymphocyte precursors in the murine intraepithelial leucocyte population. *J. Immunol.*, 1986, 136: 2121-2126.
- Ernst P., Petit A., Befus A., Rosenthal K., Ishizaka T. & Bienenstock J.** Murine intestinal intraepithelial lymphocytes. II. comparison of freshly isolated cultured intraepithelial lymphocytes. *Eu. J. Immunol.*, 1984, 15: 216-221.
- Erone P.U., Redenthal P.S., Barker J.M., Gezelter S., Inaba K. & Steinman R.M.** Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4+ T cells. *Science*, 1992, 257: 383
- Escaich S., Ritter J., Rougier P., Lepot D., Lemelin J.P., Sepetjan M. & Treppe C.** Plasma viremia as a marker of viral replication in HIV-infected individuals. *AIDS*, 1991, 5: 1189-1194.
- European study group on Heterosexual transmission of HIV.** Comparison of male to female transmission of HIV in 563 stable couples. *BMJ*, 1992, 304: 309-318.
- Ewards J.N.T. & Morris H.B.** Langerhans cells and lymphocyte subsets in the female genital tract. *Br. Gynecol.*, 1985, 92: 974-982.
- Family Health International (F.H.I.)** Edition spéciale sur les MST. 1992, 7 (2): 1-27.
- Feingold A.R., Vermund S.H., Burk R.D., Kelley K.F., Schragger L.K., Schreiber K., Munk G., Friedland G.H. & Klein R.S.** Cervical cytologic abnormalities and papilloma virus in women infected with HIV. *J. AIDS.*, 1990, 3: 896-904.
- Fisher R.A., Bertonis J.M., Meier W., Johnson V.A., Costopoulos D.S., Liu T., Tizar R., Walker B.D., Hirsh M.S., Schooley R.T. & Flavell R.A.** HIV infection is blocked in vitro by recombinant soluble CD4. *Nature*, 1988, 331: 76-78.

- Fleury F.J.** Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. *JAMA*, 1979, 242: 2556-2559.
- Forrest B.D.** Women, HIV, and mucosal immunity. *Lancet*, 1991, 337: 835-837.
- Fouts A.C. & Kraus S.J.** *Trichomonas vaginalis* re-evaluation of its clinical presentation and laboratory diagnosis. *J. Infect. Dis.*, 1980, 141: 137-143.
- Furuta Y., Eriksson K., Svennerholm B., Fredman P., Horal P., Jeanson S., Vahne A., Holmgren J. & Czerkinsky C.** Infection of vaginal and colonic epithelial cells by the human immunodeficiency virus type 1 is neutralized by antibodies raised against conserved epitopes in the envelope glycoprotein gp 120. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91: 12559-12563.
- Gallo R.C., Salahuddin S.Z., Popovic M., Shearer G.M., Kaplan M., Haynes B.F., Palker T.J., Redfield R., Oleske J., Safai B., White G., Foster P. & Markham P.d.** Frequent detection and isolation of Cytopathic Retrovirus (HTLVIII) from patient with AIDS and at risk for AIDS. *Science*, 1984, 224: 500-508.
- Gao F., Yue L., Robertson D.L., Hill S.C., Hui H., Biggar R.J., Nuquaye A.E., Whelan T.M., HO D.D., Shaw G.M., Sharp P.M. & Hahn B.H.** Genetic diversity of HIV-2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. *J. Virol.*, 1994, 68: 7433-7447.
- Garber G.E., Lemchuk-Favel L.T. & Bowie W.R.** Isolation of a cell-detaching factor of *Trichomonas vaginalis*. *J. Clin. Microbiol.*, 1989, 27: 1548-1553.
- Gartner M.B. & Hu S.L.** SIV vaccines. 1991 a year in review. *AIDS*, 1991, 5: s115-s127.
- Gartner S. & Popovic M.** Macrophage tropism of HIV-1. *AIDS. Res. Hum. Retro.*, 1990, 6: 1017-1021.
- Gaynor R.** Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression. *AIDS*, 1992, 6: 347-363.
- Gelbart S.M., Thomason J.L., Osypowski P.J., Kellett A.V., James J.A. & Broekhuizen F.F.** Growth of *Trichomonas vaginalis* in commercial culture media. *J. Clin. Microbiol.*, 1990, 28: 962-964.
- Gemen B.V., Kievits T., Nara P., Huisman H.G., Jurriaans S., Goudsmit J. & Lens P.** Qualitative and quantitative detection of HIV-1 RNA by nucleic acid sequence-based amplification. *AIDS*, 1993, 7: s107-s110.

- Gendelman H.E., Orenstein J.M., Baca L.M., Weiser B., Burger H., Kalter D.C. & Meltzer J.M.** The macrophage in persistence and pathogenesis of HIV infection. *AIDS*, 1989, 3: 475-481.
- Gerdes J. & FLad H.D.** Follicular dendritic cells and their role in HIV infection. *Immunol. Today*, 1992, 13: 81-83.
- Goeman J., Meheus A. & Piot P.** Epidemiologie des maladies sexuellement transmissibles dans les pays en développement à l'ère du SIDA. *Ann. soc. Belge Med. Trop.*, 1991, 71: 81-114.
- Goudsmit J., De Wolf F., Paul D.A., Epstein I.G., Lange J.M., Krone W.J., Speelman H., Walters E.C., Van Der Moardoa J. & Oleske J.M.** Expression of human immunodeficiency virus antigen in serum and cerebrospinal fluid during an acute chronic infection. *Lancet*, 1986, ii: 177-188.
- Goudsmit J., Lange J.M.A., Paul D.A. & Dawson G.J.** Antigenemia and antibody titers to core and envelope antigens in AIDS, AIDS-related complex and subclinical human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.*, 1987, 155: 558-560.
- Greenblatt R.M., Lukehart S.A., Plummer F.A., Quinn T.C., Critchlow C.W., Ashley R.L., D'Costa L.J., Ndinya-Achola J.O., Corey L. & Ronald A.R.** Genital ulceration as a risk factor for human immunodeficiency virus infections. *AIDS*, 1988, 2: 369-399.
- Guy-Grand D., Griscelli D. & Vassalli P.** The mouse gut T lymphocyte, a novel type of T cell. *J. Exp. Med.*, 1978, 148: 1661-1677.
- Guyader M., Emerman M., Sonigo P., Clavel F., Montagnier L. & Alizon M.** Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature*, 1987, 326: 662-669.
- Hackemann M., Grubb C. & Hill K.R.** The ultrastructure of normal squamous epithelium of human cervix uteri. *J. Ultrast. Res.*, 1968, 22: 443-457.
- Hance A.J., Grandchamp B., Levy-Frebault V., Lecossier D., Raugier J., Bocart D. & Gicquel B.** Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. *Mol. Microbiol.*, 1989, 3: 843-849.
- Hénin Y., Mandelbrot L., Henrion R., Pradinaud R., Coulaud JP. & Monagnier L.** Virus excretion in the cervicovaginal secretions of pregnant and nonpregnant HIV-infected women. *J. Acq. Imm. Def. Synd.*, 1993, 6: 72-75.

- Ho D. D., Moudgil T. & Alam M.** Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 in the blood of infected persons. *N. Engl. J. Med.*, 1989, 321: 1621-1625.
- Hoefsmit E.C.M., Duijvestijn A.M. & Kamperdijk E.W.A.** Relation between Langerhans cells, veiled cells, and interdigitating cells. *Immunobiol.*, 1982, 161: 255-265.
- Holmberg S.D., Horsburgh C.R.J., Ward J.W. & Jaffe H.W.** Biologic factors in sexual transmission of human immunodeficiency virus. *J. Infect. Dis.*, 1989, 160: 116-125.
- Holmberg S.D., Stewart J.A., Gerber A.R., Byers R.H., Lee F.K., O'Malley P.M. & Nahmias M.J.** Prior herpes simplex virus type 2 infection as a risk factor to HIV infection. *J. Am. Med. Assoc.*, 1988, 259: 1048-1050.
- Holmes K.K. & Kreiss J.** Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus: overview of a neglected aspect of the AIDS epidemic. *J. AIDS.*, 1988, 1: 602-610.
- Holodny M., Katzenstein D.A., Sengupta S. Wang A.M., Casipit C., Schwartz D.H., Konrad M., Groves E. & Merigan T.C.** Detection and quantification of human immunodeficiency virus RNA in patient serum by use the polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.*, 1991, 163: 862-866.
- Honigberg B.M.** In: *Trichomonads parasitic in humans*. Honigberg, B.M. eds. Springer-Verlag, New York, 1989.
- Honigberg B.M.** Trichomonads of importance in human medicine. In: *Parasitic. protozoa* , Kreier, J.P. eds., Acad Press, New York, 1977, 275-454.
- Hook III W. E.** Syphilis and HIV Infection. *J. Infect. Dis.*, 1989, 160 (3): 530-534.
- Hussey R.E., Richardson N.E., Kowalski M., Brown N.R., Chang H.C., Siliciano R.F., Dorfman T., Walker B., Sodroski J. & Reinhertz E.L.** A soluble CD4 protein selectively inhibits HIV replication and syncytium formation. *Nature*, 1988, 331: 78.
- Innis M.A. & Gelfand D.H.** Optimisation of PCRs. In: *PCR protocols: a guide to methods and application*, Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. eds., Acad. Press, San Diego, 1990, 3-12.
- Jackson S.** Secretory and serum IgA are inversely altered in AIDS patients. In: *Advances in mucosal immunology*, MacDonald T., Challacombe S., Bland P., Stokes C., Heatley R., McMowat A., eds. London: Kluwer Academic Publishers, 1990, 665-668.
- Janoff E., Wahl S. & Smith P.** Antibodies to human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) in the small intestine are primarily IgG, not IgA. *Gastroenterol.*, 1989, 96: 2636

- Jensen J.S., Uldum S.A., Sondergard-Andersen J., Vuust J. & Lind K.** Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.*, 1991, 29: 46-50.
- Kawasaki E.S.** Sample preparation from blood, cells, and other fluids. In: *PCR protocols: a guide to methods and applications*, Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White T.J. eds., Acad Press, San Diego, 1990, 146-152.
- Kengne P., Véas F., Vidal N., Rey JL. & Cuny G.** *Trichomonas vaginalis*: repeated DNA target for highly sensitive and specific polymerase chain reaction diagnosis. *Cell. & Mol. Biol.*, 1994, 40: 819-831.
- Kimura H., Shibata M., Kuzushima K. & Nishikawa K.** Detection and direct typing of herpes simplex virus by polymerase chain reaction. *Med. Microbiol. Immunol.*, 1990, 179: 177-184.
- Klatzman D., Champagne E. & Chamaret S.** T-lymphocytes T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature*, 1984, 767:
- Klein J. & Kagnoff M.** Spontaneous in vitro evolution of lytic specificity of cytotoxic T lymphocyte clones isolated from murine intestinal epithelium. *J. Immunol.*, 1984, 133: 2955-2960.
- Klein J., Le François L. & Kagnoff M.** A murine cytotoxic T lymphocyte clone from the intestinal mucosa that is antigen-specific for proliferation and displays broadly reactive inducible cytotoxic activity. *J. Immunol.*, 1985, 135: 3697-3703.
- Klotman M.E., Kim S., Buchbinder A., DeRossi A., Baltimore D. & Won-Stall F.** Kinetics of expression of multiply spliced RNA in early human immunodeficiency virus type-1 infection of lymphocytes and monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, 88: 5011
- Knight D.M., Macatonia S.E. & Patterson S.** HIV infection of dendritic cells. *Int. Rev. Immunol.*, 1990, 6: 163
- Koumaré B., Bougoudogo F., Traoré H. & Diakites S.** Prevalence de la conjonctivite à *Neisseria gonorrhoeae* et à *Chlamydia trachomatis* dans une population de 280 nouveau-nés vus en consultation post-natale dans le centre de santé maternelle et infantile de Missira à Bamako. *Médecine Afrique Noire*, 1993, 40 (7): 140-147.

- Kraal G., Breel M., Janse M. & Bruin G.** Langerhans cells, vield cells and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. *J. Exp. Med.*, 1986, 163: 981-997.
- Kreiger J.N., Coombs R.W. & Collier A.C.** Recovery of human immunodeficiency virus type 1 from semen: minimal impact of stage of infection and current antiviral therapy. *J. Infect. Dis.*, 1991, 163: 386-388.
- Kreiss J., Willerford D.M., Hensel M., Emonyi W., Plumer F., Ndinya-Achola J., Roberts P.L., Hoskyn J., Hillier S., Kiviat N. & Holmes K.K.** Association between cervical inflammation and cervical shedding of human immunodeficiency virus DNA. *J. Infect. Dis.*, 1994, 170: 1597-1601.
- Krieger J., Holmes K., Spence M., Rein M., McCormack W. & Tam M.** Geographic variation among isolates of *Trichomonas vaginalis*: Demonstration of antigenic heterogeneity by using monoclonal antibodies and the indirect immunofluorescence technique. *J. Infect. Dis.*, 1985, 152: 979-984.
- Krieger J.N.** Urologic aspects of trichomoniasis. *Invest. Urol.*, 1981, 18: 411-417.
- Krieger J.N., Milton R.T., Stevens C.E., Nielsen I.O., Hale J., Kiviat N.B. & Holmes K.K.** Diagnosis of Trichomoniasis: comparison of conventional wet-mount examination with cytologic studies, cultures, and monoclonal antibody staining of direct specimens. *JAMA*, 1988, 259: 1223-1227.
- Krieger J.N., Verdon M., Siegel N., Critchow C. & Homes K.K.** Risk assessment and laboratory diagnosis of Trichomoniasis in men. *J. Infect. Dis.* 1992, 166 : 1362-1366.
- Kripke M., Munn C., Jeevan A., Tang J-M. & Bucana C.** Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. *J. Immunol.*, 1990, 145: 2833-2837.
- Kupiec-Weglinski J., Austin J. & Morris P.** Migration patterns of dendritic cells in the mouse. Traffic from blood, and T-cell-dependent and independent entry into lymphoid tissue. *J. Experiment. Med.*, 1988, 167: 632-45.
- Kutteh W.H., Hatch K.D., Blackwell R.E. & Mestecky J.** Secretory immune system of female reproductive tract: I. Immunoglobulin and secretory component containing cells. *Obstet. Gynecol.*, 1988, 71: 56-60.

- Kutteh W.H., Kutteh C., Blackwell R.E., Carr B., Gorr H. & Mestecky J.** Secretory immune system of the female reproductive tract. II. Local immune system in normal and infected fallopian tube. *Fertil. Steril.*, 1990, 54: 51-55.
- Laga M., Diallo M.O. & Buvé A.** Iner-relationship of sexually transmitted diseases and HIV: Where are we now? *AIDS*, 1994, 8: S119-S124.
- Laga M.** Epidemiology and control of sexually transmitted diseases in developing countries. *Sex. Trans. Dis.*, 1994, 21: S45-S50.
- Laga M., Manoka A., Kivuvu M., Malele B., Tuliza M., Nzila N., Goeman J., Behets F., Batter V., Alary M., Heyward W.L., Ryder R. W. & Piot P.** Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. *AIDS*, 1993, 7: 95-102.
- Laga M., Nzila N., Malele M., Bush T.J., Behets F., Heyward W.L., Piot P. & Ryder R.** Non ulcerative sexually transmitted diseases (STD) as risk factors for HIV infection, Th. C.97. Sixth International Conference on AIDS, San Francisco, June 1990, *abstract*. 20-24.
- Laga M., Plummer F.A., Nzanze H., Brunham R.C., Nammaara W., Brunham R.C., Ndinya-Achocha J.O., Maitha G., Ronald A.R., D'Costa L.J. & Bhullar V.B.** Epidemiology of ophthalmia neonatorum in Kenya. *Lancet*, 1986, ii: 1145-1149.
- Langhoff E.F., Terwiliger E.F., Bos H.J., Kalland K.H., Pozansky M.C., Bacon O.M.L. & Haseltine W.A.** Replication of human immunodeficiency virus type 1 in primary dendritic cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, 88: 7998-8002.
- Langlade-Demoyen P., Ngo-Giang-Huong N., Ferchal F. & Oksenhender E.** Human immunodeficiency virus (HIV) *nef*-specific cytotoxic T lymphocytes in noninfected hetetosexual contact of HIV-infected individuals. *J. Cli.; Invest.*, 1994, 93: 1293-1297.
- Larson J., Wulff H. & Friis-Moller A.** Comparison of a fluorescent monoclonal antibody assay and a tissue culture assay for routine detection of infections caused by *Chlamydia trachomatis*. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, 1986, 5: 554-558.
- Laure F., Courgnaud V., Rouzioux C., Blanche S., Veber F., Burgard M., Jacomet C., griscelli C. & Brechot C.** Detection of HIV DNA in infants and children by means of polymerase chain reaction. *Lancet*, 1988, ii: 538-541.

- Lazaro I., Naniche D., Signoret N., Bernard A.M., Marguet D., Klatzmann D., Dragic T., Alizon M. & Sattentau Q.** Factors involved in entry of the human immunodeficiency virus type-1 into permissive cells: Lack of evidence of a role of CD26. *J. Virol.*, 1994, 68: 6535-6546.
- Lee H.H., Chernesky M.A., Schachter J., Burczak J.D., Andrews W.W., Muldoon S., Leckie G. & Stamm W.E.** Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* genitourinary infection in women by ligase chain reaction assay of urine. *Lancet*, 1995, 28: 213-216.
- Lee Y.S.** A comparison of reverse transcriptase and antigen capture assays for detection of HIV. *J. Virol. Meth.*, 1988, 20: 89-93.
- Lehner T., Bergmeier L.A., Panagiotidi C., Tao L., Brookes R., Adams S.E., Klavinskis L.S., Walker P., Walker J., Ward R.G. & Hussain L.** Induction of mucosal and systemic immunity to a recombinant simian immunodeficiency viral protein. *Science*, 1992, 258: 1365-1369.
- Leonard G., Verdier M., Sangaré A., Rey J.L. & Denis F.** Specificity of new peptide immunoassays versus other immunoassays and agglutination tests for detection of HIV antibody in African sera. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, 1991, 10: 636-640.
- Levy D.N., Fernandes L.S., Williams W.V. & Weiner D.B.** Induction of cell differentiation by human immunodeficiency virus 1 Vpr. *Cell.*, 1993, 72: 541-550.
- Levy J.A., Hoffman A.D., Kramer S.M., Landis J.A., Shimabukuro J.M. & Oshiro L.S.** Isolation of lymphocytopathic retrovirus from a San Francisco Patient with AIDS. *Science*, 1984, 225: 840-846.
- Lifson A.R., Stanley M., Pane J., Parre J., O'Malley P.M., Wilber J.C., Stanley A., Jeffery B., Rutherford G.W. & Sohmer P.R.** Detection of human immunodeficiency virus DNA using the polymerase chain reaction in well-characterized group of homosexual and bisexual men. *J. infect. Dis.*, 1990, 161: 436-439.
- Lin H.J., Meyers L.E., Yen-Lieberman B., Hollinger F.B., Henrard D., Hooper J.C., Kokka R., Kwok S., Rasheed S., Vahey M., Winters M.A., McQuay L.J., Nara P.L., Reichelderfer P., Coombs R.W. & Jackson J.B.** Multicenter Evaluation of quantification methods for plasma immunodeficiency virus type 1 RNA. *J. Infect. Dis.*, 1994, 170: 553-562.

- Louwagie J., Janssens W., Mascola J., Heyndrickx L., Hegerich P., van der Groen G., Mc Cutchan F.E. & Burke D.D.** Genetic diversity of the envelope glycoprotein from human immunodeficiency virus type 1 isolates of African origins. *J. Virol.*, 1995, 69: 263-271.
- Luban J. & Goff S.P.** Binding of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA to recombinant HIV-1 gag polyprotein. *J. Virol.*, 1991, 65: 3203-3212.
- Mabey D.C.W., Lloyd-Evans N.E., Conteh S. & Forsey T.** Sexually transmitted diseases among randomly selected attenders at an antenatal clinic in Gambia. *Br. J. Vener. Dis.*, 1984, 60: 331-336.
- Mabey D.C.W., Wall R.A. & Bello C.S.** Aetiology of genital ulceration in Gambia. *Genitourin. Med.*, 1987, 63: 312-315.
- Macatonia S., Lau R., Patterson S., Pinching A. & Knight S.** Dendritic cell infection, depletion and dysfunction in HIV-infected individuals. *Immunol.*, 1990, 71: 38-45.
- Mahony J.B. & Chernesky M.A.** Effect of swab type and storage temperature on the isolation of *Chlamydia trachomatis* from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 1985, 22: 865-867.
- Malele B., Manoka A.T., Kivuvu M. et al.** The impact of HIV infection on the incidence of STD in high risk women. VII International Conference on AIDS. Florence 1991, *Abstract W.C.* 104.
- Maniatis T., Fritsch E.F. & Sambrook J.** Molecular cloning. In: *A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982.
- March C.** "DNA Strider": a "C" program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple MacIntosh family computers. *Nucleic Acids Res.*, 1988, 16: 1829-1836.
- Mardh P.A., Melin I., Bobeck S., Laurin J., Nilsson T.C. & Alexander J.R.** Colonisation of pregnant and puerperal women and neonates with *Chlamydia trachomatis*. *Br. J. Vener. Dis.*, 1980, 56: 96-100.
- Marthas M., Sutjipto S., Miller C., Higgins J., Torten J., Unger R., et al.** Effect of live-attenuated and whole-inactivated simian immunodeficiency virus vaccines against intravenous and intravaginal challenge. In: *Vaccines*, Brown F., Chanock R.M., Ginsberg H.S., Lerner R.A. eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992: 117-122.

- Martin D.H., Koutsky L., Eschenbach D.A., Dalie R., Benedetti J.K. & Holmes K.K.** Prematurity and prenatal mortality in pregnancies complicated by maternal *Chlamydia trachomatis* infections. *JAMA*, 1982, 247: 1585-1588.
- Masur H., Michelis M.A., Greene J.B., Onorato I., Vade-Stouwe R.A., Holzman R.S., Wormser G., Brettman L., Lange M., Murray H.W. & Cunningham-Rundles S.** An outbreak of manifestation of cellular immune dysfunction. *New Engl. J. Med.*, 1981, 305: 1431-1438.
- May R.M., Anderson R.M. & Blower S. M.** The epidemiology and transmission dynamics of HIV-AIDS. *Deadalus*, 1989, 118-163.
- McDermott M. R., Goldsmith C.H., Rosenthal K.L. & Brais L.J.** T-lymphocytes in genital lymph nodes protect mice from intravaginal infection with herpes simplex virus type 2. *J. Infect. Dis.*, 1989, 159: 460-466.
- McDermott M.R., Brais L.J. & Eveleigh M.J.** Mucosal and systemic antiviral antibodies in mice inoculated intravaginally with herpes simplex virus type 2. *J. Gen. Virol.*, 1990, 71: 1497-1504.
- McDermott M.R., Smiley J.R., Leslie P., Brais J., Rudzroga H.E. & Bienenstock J.** Immunity in the female genital tract after intravaginal vaccination in mice with an attenuated strain of Herpes simplex Virus Type 2. *J. Virol.*, 1984, 51: 747-753.
- McDermott R., Franklin G., Jenkins K., Kodner I., Nash G. & Weinrieb I.** Human intestinal mononuclear cells. I. Investigation of antibody-dependent, lectin-induced and spontaneous cell-mediated cytotoxic capabilities. *Gastroenterology.*, 1980, 78: 47-56.
- McDougal J.S., Cort S.P., Kennedy M.S. Cabridilla C.D., Feorino P.M., Francis D.P., Nicks D., Kalyanaman V.S. & Martin L.S.** Immunoassay for the detection and quantification of infectious human retrovirus, lymphadenopathy-associated virus (LAV). *J. Immunol. Meth.*, 1985, 76: 171-183.
- McKeating J.A., Balfe P., Clapham P. & Weiss R.A.** HIV susceptibility conferred to human fibroblast by cytomegalovirus-induced Fc receptor. *Nature*, 1990, 343: 659
- Merriman H., Woods S., Winter C., Fahnlander A. & Corey L.** Secretory IgA antibody in cervicovaginal secretions from women with genital infection due to herpes simplex virus. *J. Infect. Dis.*, 1984, 149: 505-510.
- Mertens E.T., Hayes J.R. & Smith G.P.** Epidemiological methods to study the interaction between HIV infection and other sexually transmitted diseases. *AIDS.*, 1991, 4: 57-65.

- Mertens T.E., Burton A., Stoneburner R., Sato P., Beer D.L., Carél M. & Belsey E.** Global estimates and epidemiology of HIV infections and AIDS. *AIDS.*, 1994, 8: s361-s372.
- Messing J.** New M13 vectors for cloning. *Meth. Enzymol.*, 1983, 101: 20-27.
- Michael N.L., Mo T., Merzouki A., O'Shaughnessy M., Oster C., Burke D.S., Redfield R.R., Birx D.L. & Cassol S.A.** Human immunodeficiency virus type 1 cellular RNA load and splicing patterns predict disease progression in a longitudinally studied cohort. *J. Virol.*, 1995, 69: 1868-1877.
- Miller C.J., Alexander N.J., Sutjipto A.G., Jennings M. & Marx P.A.** The effect of virus dose and monoxynol-9 on the genital transmission of SIV in rhesus macaque. *J. Med. Primatol.*, 1990, 19: 401-409.
- Miller C.J., Alexander N.J., Sutjipto S., Lackner A.A., Hendrickx A.G., Gettie A., Lowenstine L.J., Jennings M. & Marx P.A.** Genital mucosal transmission of simian immunodeficiency virus: animal model for transmission of simian immunodeficiency virus. *J. Virol.*, 1989, 63: 4277-4284.
- Miller C.J., Alexander N.J., Vogel P., Anderson J. & Marx P.A.** Mechanism of genital transmission of SIV: A hypothesis based on transmission studies and the location of SIV in the genital tract of chronically infected female rhesus macaque. *J. Med. Primatol.*, 1992a, 21: 64-68.
- Miller C.J., Kang D.W., Marthas M., Moldoveanu Z., Kiyono H., Marx P., Eldridge J.H., Mestecky J. & McGhee J.R.** Genital secretory immune response to chronic SIV infection: a comparison between intravenously and genitally inoculated rhesus macaques. *Clin. Exp. Immunol.*, 1992c, 88: 520-526.
- Miller C.J., Vogel P., Alexander N.J., Sutjipto S., Hendrickx AG & Marx P.A.** Localization of SIV in genital tract of chronically infected female rhesus macaque. *Am. J. Pathol.*, 1992b, 141: 655-660.
- Miller C.J., Marthas M., Torten J., Alexander N.J., Moore J.P., Doncel G.F. & Hendrickx A.G.** Intravaginal inoculation of Rhesus macaques with cell-free simian immunodeficiency virus results in persistent or transient viremia. *J. Virol.*, 1994, 68: 6391-6400.
- Miller M.C., McChesney M. & Moore P.F.** Langerhans cells, macrophages and lymphocyte subsets in the cervix and vagina of rhesus macaque. *Lab. Invest.*, 1992, 67: 628-634.

- Montagnier L., Gruet J., Chamaret S., Dauguet C., Ascaler C., Guetard D., Nugeyre M., Barre-Sinoussi F., Chermann J.C., Brunet J.B., Klatzmann D. & Gluckman J.C.** Adaptation of human lymphadenopathy-associated virus (LAV) to replication in EBV-transformed B. lymphoblastoid cell lines. *Science*, 1984, 225: 63.
- Morris H.H.B., Gatter K.C., Stein H. & Mason D.Y.** Langerhans cells in human cervical epithelium: an immunohistologic study. *Br. J. of Obstet. Gynecol.*, 1983, 90: 400-411.
- Moses A., Bloom F.E., Pauza C.D. & Nelson J.A.** Human immunodeficiency virus infection of human brain capillary endothelial cells occurs via a CD4/galactosylceramide-independent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90: 10474-10478.
- Moses M., Bradley J.E., Nagelkerke N.J.D., Ronald A.R., Ndinya-Achola J.O., Plummer F.A.** Geographical patterns of male circumcision practices in Africa : association with HIV seroprevalence. *Int. J. Epidemiol.* 1990 ; 19 : 693-697
- Moss G.B., Clemetson D., D'Costa L. Plummer F.A., Ndinya Achocha J.O., Reilly M., Holmes K.K., Piot P., Maitha G.M. & Millier S.L.** Association of cervical ectopy with heterosexual transmission of human immunodeficiency virus: Results of a study of couples in Nairobi, Kenya. *J. Infect. Dis.*, 1991, 164: 588-591.
- Muir D.G. & Belsey M.A.** Pelvic inflammatory disease and its consequences in the developing world. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1980, 138, 913-928.
- Mullis K.B. & Faloona F.A.** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 1987, 155: 335-350.
- Murphey-Corb M., Martin L.N., Davison-Fairburn B., Montelaro R.C., Miller M., West M., Ohkawa S., Baskin G.B., Zhang J.Y., Putney S.D., Allison A.C. & Eppstein D.A.** A formalin-inactivated whole SIV vaccine confers protection in macaques. *Science*, 1989, 246: 1293-1297.
- Nauss K., Pavlina T., Kumar V. & Newberen P.** Functional characteristics of lymphocytes isolated from the rat large intestine. *Gastroenterol.*, 1984, 86: 468-475.
- Nkengasong J.N., Janssens J., Heyndrickx L., Franssen K., Ndumbe P.M., Motte J., Leonaers A., Ngolle M., Ayuk J., Piot P. & van der Groen G.** Genotypic subtypes of HIV-1 in Cameroon. *AIDS*, 1994, 8: 1405-1412.

- Nzila N., Laga M., Thiam A.M., Mayimona K., Edidi B. Dyck van E., Behets F., Hassig S., Nelson A., Mokwa K., Ashley L. R., Piot P. & Ryder W.R.** HIV and other sexually transmitted diseases among female prostitutes in Kinshassa. *AIDS*, 1991, 5 : 715-721.
- Osoba A.O.** Sexually transmitted disease in tropical Africa. A review of the present situation. *Br. J. Ven. Dis.*, 1981, 57: 89-94.
- Ostergaard L., Birkelund S. & Christiansen G.** Use of polymerase chain reaction for detection of *Chlamidia trachomatis*. *J. Clin. Microbiol.*, 1990, 28: 1254-1260.
- Ottmann M., Innocenti P., Thenaday M., Nicoud M., Pelloquin F. & Seigneurin J.M.** The polymerase chain reaction for detection of HIV genomic RNA in plasma from infected individuals. *J. Virol. Meth.*, 1991, 31: 276-283.
- Ou C.Y., Kwok S., Mitchell S.W., Nack D.N., Sninsky J.J., Krbs J.W., Feonino P., Warfield D. & Schochetman G.** DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells. *Science*, 1988, 239: 295-297.
- Pacès J., Urbankova V. & Urbanek P.** Cloning and characterization of a repetitive DNA sequence specific for *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1992, 54 : 247-256.
- Panke E.S., Yang L.I., Leist P.A., Magenney P., Fry R.J. & Lee R.F.** Comparison of Gen-probe DNA probe test and culture for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* in endocervical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 1991, 29: 883-888.
- Pao C.C., Lin S.S., Yang T.E., young T.A., Lee P.S. & Lin J.Y.** Deoxyribonuceic acid hybridization analysis for the urogenital *Chlamydia trachomatis* infections in women. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1987, 156: 195-199.
- Parr E. & Parr M.A.** Comparison of antibody titers in mouse uterine fluid after immunization by several routes, and the effect of the uterus on antibody titers in vaginal fluid. *J. Reprod. Fertil.*, 1990, 89: 619-625.
- Parr M.B., Kepple L. & Parr E.L.** Antigen recognition in the female reproductive tract: II Endocytosis of horseradish peroxidase by Langerhans cells in murine vaginal epithelium. *Biol. Reprod.*, 1991, 45: 261-265

- Paterlini P., Lallemand-Le Coeur S., Lallemand M. M'Pele P., Daza M.C., Terre S., Moncany M., Jourdain G., Courgnaud V. & N'Zingoula S.** Polymerase chain reaction for studies of mother to child transmission of HIV1 in Africa. *J. Med. virol.*, 1990, 30: 53-57.
- Patterson S. & Knight S.C.** Susceptibility of human peripheral blood dendritic cells to infection by human immunodeficiency virus. *J. Gen. Virol.*, 1987, 68: 1177-1181.
- Patterson S., Gross J., Bedford P. & Knight S.C.** Morphology and phenotype of dendritic cells from peripheral blood and their productive and non-productive infection with human immunodeficiency virus type-1. *Immunology*, 1991, 72: 361-367.
- Paul D.A., Falk L.A., Kessler H.A., Chase R.M., Blaauw B., Claudwin D.S. & Landay A.L.** Correlation of serum HIV antigen and antibody with clinical status of HIV-infected patients. *J. Med. Virol.*, 1987, 22: 357-363.
- Pepin J., Dunn D., Gaye I., Alonso P., Egboga A., Tedder R., Piot P., Berry N., Schellenberg D., Whittle H. & Wilkins A.** HIV-2 infection among prostitutes working in Gambia: association with serological evidence of genital ulcer diseases and with generalized lymphadenopathy. *AIDS*, 1991, 5: 69-75.
- Pepin J., Quigley M., Todd J., Gaye I., Janneh M., Van Dick E., Piot P. & Whittle H.** Association between HIV-2 infection and genital ulcer diseases among male sexually transmitted disease patients in the Gambia. *AIDS*, 1992, 6: 489-493.
- Philip A., Carter-Scott P. & Rogers C.** An agar culture technique to quantitate *Trichomonas vaginalis* from women. *J. Infect. Dis.*, 1987, 155: 304-308.
- Piatak M. Jr., Luk K.C., Williams B. & Lifson J.D.** Quantitative competitive polymerase chain reaction for accurate quantitation of HIV DNA and RNA species. *Biotechniques*, 1993b, 14: 70-79.
- Piatak M. Jr., Saag M.S., Yang L.C., Clark S.J., Kappes J.C., Luck K.C., Hahn B.H., Shaw G.M. & Lifson J.D.** High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science*, 1993a, 259: 1749-1754.
- Piot P. & Meheus A.** Epidémiologie des maladies sexuellement transmissibles dans les pays en développement. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.*, 1993, 63: 87-110.
- Piot P. & Tezzo R.** The epidemiology of HIV and other sexually transmitted infections in the developing world. *Scand. J. Infect. Dis.*, 1990, 69: s89-s97.

- Plummer F. A., Wainberg M. A., Plourde P., Jessaminutese P., D'Costa J. L., Wamola I. A. & Ronald A. R.** Detection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV1) in genital ulcer exudate of HIV-1-infected men by culture and gene amplification. *J. Infect. Dis.*, 1990, 161 : 810-811.
- Plummer F.A., Simonsen J.N., Cameron D.W., Ndinya A.J., Kreiss J.K., Gakinya M.N., Waiyaki P., Cheang M., Piot p. & Ronald A.R.** Cofactors in male-female sexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J. Infect. Dis.*, 1991, 163: 233-239.
- Polk B.F., Fox R., Brookmeyer R., Kanchanaraksa S., Kaslow R., Visscher B., Rinaldo C. & Phair J.** Predictors of the acquired immunodeficiency syndrome developing in a cohort of seropositive homosexual man. *N. Engl. J. Med.*, 1987, 316: 61-66.
- Polsky B., Gold J., Wihmey E., Dryjanski, Brown A. & Schiffman G.** Bacterial pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency virus. *Ann. Intern. Med.*, 1986, 104: 38-41.
- Pomerantz R.J., De la Monte S.M., Donegan C.E., Rota T.R., Vogt M.W., Craven D.E. & Hirsch M.C.** Human immunodeficiency virus (HIV) infection of uterine cervix. *Ann. Intern. Med.*, 1988, 108: 321-327.
- Pruss D., Bushman FD. & Wolffe AP.** HIV integrase directs integration to sites of severe DNA distortion within the nucleosome core. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91: 5913-5917.
- Quinn C.T., Mann J.M., Curran J.W. & Piot P.** AIDS in Africa: an epidemiologic paradigm. *Science*, 1986, 234: 955-963.
- Rappolee D.A., Mark D., Banda M.J., Werb Z.** Wound macrophage express TGF α and other growth factors *in vivo*: analysis by mRNA phenotyping. *Science*, 1988, 241: 708-712.
- Rebello R., Green F.H.Y. & Fox H.** A study of the secretory immune system of the female reproductive tract. *Br. J. Obstet. Gyn.*, 1975, 82: 812-816.
- Richardson J.H., Child L.A. & Lever A.M.L.** Packaging of human immunodeficiency virus type RNA requires cis-acting sequences outside the 5' leader region. *J. Virol.*, 1993, 67: 3997-4005.

- Riley D.E., Samadpour M. & Krieger J.N.** Detection of variable DNA repeats in diverse eucaryotic micro-organisms by a single set of polymerase chain reaction primers. *J. Clin. Microbiol.*, 1991, 29: 2746-2751.
- Riley E.D. & Krieger N.J.** Rapid and practical DNA isolation from *Trichomonas vaginalis* and other nuclease-rich protozoa. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1992a, 51: 161-164.
- Riley E.D., Roberts C.M., Takayama T. & Krieger N.J.** Development of a polymerase chain-based diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. *J. Clin. Microbiol.*, 1992b, 30: 465-472.
- Robinson Jr., Montefiori D.C. & Mitchell W.M.** Complement-mediated antibody-dependent enhancement of HIV-1 infection requires CD4 and complement receptor. *Virology*, 1990, 175: 600-604.
- Rogers V.D., Fassett R. & Kagnoff M.F.** Abnormalities in intestinal mucosal T cells in homosexual populations including those with the lymphadenopathy syndrome and immunodeficiency syndrome. *Gastroenterology*, 1986, 90: 552-558.
- Roussel F., De Carli G. & Brasseur PH.** A cytopathic effect of *Trichomonas vaginalis* probably mediated by a mannose/N-acetyl-glucosamine-binding lectine. *Internat. J. Parasitol.*, 1991, 21: 941-944.
- Rowland-Jones S., Sutton J., Ariyoshi K., Dong T., Gotch F., McAdam S., Whitby D., Sabally S., Gallimore A., Corrah T., Takiguchi M., Schultz T., McMichael A. & Whittle H.** HIV-specific cytotoxic T-cells in HIV-exposed but uninfected Gambian women. *Nature Med.*, 1995, 1: 59-64.
- Rubino S., Muresu R., Rappelli P., Fiori L.P., Rizzu P., Erre G. & Cappuccinelli P.** Molecular probe for identification of *Trichomonas vaginalis* DNA. *J. Clin. Microbiol.*, 1991, 29 (4): 702-706.
- Saag M.S., Emini E.S., Laskin O.L., Laskin O.L., Douglas J., Lapidus W.I., Schleif W.A., Whitley R.J., Hildebrand C., Byrnes V.W., Krappes J.C. & HO D.** A short-term clinical evaluation of L-697,661, a non-nucleotide inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase. *N. Engl. J. Med.*, 1993, 329: 1065-1072.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B. & Ehrlich H.A.** Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988, 239: 487-491.

- Sanger F., Nicklen S. & Coulson A.R.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1977, 74: 5463-5467.
- Sattentau Q.J. & Moore J.P.** The role of CD4 in HIV binding and entry. *Biol. Sci.*, 1993, 342: 59-66.
- Scaden D.T., Wang Z. & Groopman J.E.** Quantitation of plasma human immunodeficiency virus type-1 RNA by competitive polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.*, 1992, 165: 1119-1123.
- Schachter J.** Chlamydia: In *manual of clinical microbiology*. Balows A., Hausler W.J., Herrmann Jr. K.H., Isenberg H.D., Shadomy H.J. 4e eds. Washington, D.C. 1991, 1045-1053.
- Schockmel G.A., Somoza C., Davis S.J., Williams A.F. & Healey D.** Construction of a binding site for human immunodeficiency virus type-1 gp 120 in rat CD4. *J. Exp. Med.*, 1992, 175: 301-304.
- Schultz A.M. & Scott E.J.** Primate models for AIDS vaccines. *AIDS*, 1994, 8: S203-S212.
- Schultz K.F., Cates W. & O'Hara P.R.** The serious sequelae of syphilis and gonorrhoea during pregnancy in Africa. In *Proceedings of the Africa Regional Conference on Sexually Transmitted Diseases*. Harare. 1987, 144-157.
- Seed J., Allen S., Mertens T., Hudes E., Serufulira A., Carael M., Karita E., Van de Perre P. & Nsengumuremyi F.** Male circumcision, sexually transmitted disease, and risk of HIV. *J. of Acq. Imm. Def. Synd. & Hum. Retrov.*, 1995, 8: 83-90.
- Semple M., Loveday C., Weller I. & Tedder R.** Direct measurement of viraemia in patients infected with HIV-1 and its relationship to disease progression and zidovudine therapy. *J. Med. Virol.*, 1991, 35: 38-45.
- Shelley W. & Juhlin L.** Langerhans cells from a reticuloepithelial trap for external contact allergens. *Nature*, (London) 1976, 261: 46-47.
- Shelley W. & Juhlin L.** Selective uptake of contact allergens by the Langerhans cell. *Arch. Dermatol.*, 1977, 113: 187-192.
- Sherman K.J., Daling J.R., Stergachis A., Weiss N.S., Foy H.N., Wang S.P. & Grayston J.T.** Sexually transmitted diseases and tubal pregnancy. *Sex. Transm. Dis.*, 1990, 17: 115 - 121.

- Siboulet A. & Coulaud J.P.** *In* : Maladies sexuellement transmissibles, eds. Masson, Paris , 1991, 1-10.
- Siegal F.P., Lopez C., Hammer G.S., Brown A.E., Kornfeld S.J., Gold J., Hassett J., Hirschman S.Z., Cunningham-Rundles C. & Adelsberg B.R.** Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. *New Engl. J. Med.*, 1981, 305: 1439-1444.
- Silberberg-Sinakin I., Thorbecke G.J., Baer R.L., Rosenthal S.A. & Berezowsky V.** Antigen-bearing Langerhans cells in skin, dermal lymphocytes and in lymph nodes. *Cell. Immunol.*, 1976, 25: 137-151.
- Simonsen N.J., Cameron W.D., Gakinya N.M., Ndinya-Achola O.J., D'Costa J.L., Karasira P., Cheang M., Ronald R.A., Piot P. & Plumer A.F.** Human immunodeficiency virus among men with sexually transmitted diseases. Experience from a center in Africa. *New Engl. J. Med.*, 1988, 4: 274-277.
- Spence M.R., Hollander D.H., Smith J., McCaig L., Sewell D. & Brockman M.** The clinical and laboratory diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. *Sex. Transm. Dis.*, 1980, 7: 168-171.
- Stamm E.W., Handsfield H.H., Rompalo M.A., Ashley L.R., Roberts L.P. & Corey L.** The association between genital ulcer disease and acquisition of HIV infection in homosexual men. *JAMA*, 1988, 260: 1429-1433.
- Starnbach M.N., Bevan M.J. & Lampe M.F.** Protective cytotoxic T lymphocytes are induced during murine infection with *Chlamydia trachomatis*. *J. Immunol.*, 1994, 153: 5183-5189.
- Stein B.S., Gowda S.D., Lifson J.D., Penhallow R.C., Bensch K.G. & Engelman E.G.** pH-independent HIV entry into CD4 positive T cells via fusion to the plasma membrane. *Cell.*, 1990, 49: 659-668.
- Steinman R.M.** The dendritic cell system and its role in immunogenicity. In: Paul W.E., Fatham C. G., Metzger H., eds. *Ann. Rev. Immunol.* Palo Alto: Annual Reviews Inc., 1991, 271-296.
- Stevenson M.** Identification of factors that govern HIV-1 replication in non dividing cells. *AIDS Res. Hum. Retrovirus.*, 1994, 10: S11-S15.

- Stuyver L., Rossau R., Wyseur A., Duhamel M., Vanderborcht B., Van Heuverswyn H. & Maertens G.** Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J. Gen. Virol.*, 1993, 74: 1093-1102.
- Stuyver L., Van Arnhem W., Wyseur A., Hernandez F., Delaporte E. & Maertens G.** Classification of hepatitis C viruses based on phylogenetic analysis of the envelope 1 and nonstructural 5b regions and identification of five additional subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91: 1-5.
- Tan X., Pearce-Pratt R. & Phillips D.M.** Productive infection of a cervical epithelial cell line with human immunodeficiency virus : implications for sexual transmission. *J. Virol.*, 1993, 67 : 6447-6452.
- Taylor H., Amsrtong S. & Dimmock N.** Quantitative relationships between an influenza virus and neutralizing antibody. *Virology*, 1989, 159: 288-298.
- Thapar M., Parr E & Parr M.** Secretory immune responses in mouse vaginal fluid after pelvic, parenteral or vaginal immunization. *Immunol.*, 1990, 70: 121-125.
- Torian L.V., Weisfuse I.B., Makki H.A., Benson D.A., DiCamillo L.M. & Toribio F.E.** Increasing HIV-1 seroprevalence associated with genital ulcer disease, New York City, 1990-1992. *AIDS*, 1995, 9: 177-181.
- Vahlne A., Horal P., Eriksson K., Jeanson S., Rymo L., Hedström K.G., Czerkinsky C., Holmgren J. & Svennerholm B.** Immunization of monkey with synthetic peptides disclose conserved areas on gp 120 of human immunodeficiency virus type 1 associated with cross-neutralizing antibody and T-cell recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1991, 88: 10744-10748.
- Van de Perre P., Nzaramba D., Allen S., Riggin C.H., Sprecher-Goldberger S. & Butzler J.P.** Comparaison of six serological assays for human immunodeficiency virus antibody detection in developing countries. *J. Clin. Microbiol.*, 1988, 26: 552-556.
- Van Dyck E., Catalan F., Plot P. & Meheus A.** Directives de laboratoire applicables au diagnostic des maladies sexuellement transmissibles. Programme for sexually transmitted diseases. 1994 VDT/89. 443.
- Veas F., Breniere S.F., Cuny G., Brengues C., Solari A. & Tibayrenc M.** General procedure to construct highly specific kDNA probes for clones of *Trypanosoma cruzi* for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Cell. Mol. Biol.*, 1991, 37: 73-84.

- Verhofstede C., Reniers S., Van Wanseele F. & Plum J.** Evaluation of proviral copy number and plasma RNA level as early indicators of progression in HIV infection: Correlation with virological and immunological markers of diseases. *AIDS*, 1994, 8: 1421-1427.
- Vogt M.W., Craven D.E., Crawford D.F., Witt D.J., Byington R., Schooley R.T. & Hirsch M.S.** Isolation of HTLVIII/LAV from cervical secretions of women at risk for AIDS. *Lancet*, 1986, 1: 525-527.
- Vogt M.W., Witt D.J., Craven D.E., Byington R., Crawford D.F., Hutchinson M.S., Schooley R.T. & Hirsch M.S.** Isolation patterns of the human immunodeficiency virus from the cervical secretions during the menstrual cycle of women at risk for acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Intern. Med.*, 1987, 106: 380-382.
- Wasserheit J.N.** Epidemiological synergy: interrelationships between human immunodeficiency virus infection and other sexually transmitted diseases. *Sex. Trans. Dis.*, 1992, 19: 61-77.
- Whimbey E., Gold J., Polsky B., Dryjanski J., Hawkin C., Blevins A., Brannon P., Kiehn T., Brrown A. & Armstrong D.** Bacteremia and fungemia in patients with AIDS. *Ann. Intern. Med.*, 1986, 104: 511-514.
- Wilde J., Eiden J. & Yolken R.** Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions. *J. Clin. Microbiol.*, 1990, 28: 1300-1307.
- Winters MA., Holodniy M., Katzenstein DA. & Merigan TC.** Quantitative RNA and DNA gene amplification can rapidly monitor HIV infection and antiviral activity in cell cultures. *PCR Meth. & Applic.*, 1992, 1: 257-262.
- Wira C. & Sandoe C.** Sex steroid hormone regulation of IgA and IgG in rat uterine secretions. *Nature*, (London), 1977, 268: 534-536.
- Wolner-Hansen P., Krieger J.N., Stevens C.E., Kiviat N.B., Koutsky L., Critchlow C., DeRouen T., Hillier S. & Holmes K.K.** Clinical manifestations of vaginal Trichomoniasis. *JAMA*, 1989, 261: 571-576.
- World Health Organisation.** Programme for sexually transmitted diseases. 1989a WHO/VDT/89. 443
- World Health Organization.** Maternal and perinatal infections. 1991, MCH/91: 10.

- World Health Organization.** STD treatment strategies. Geneva, World Health Organization. 1989b, WHO/VDT/89. 447.
- Wu C.H., Lee M.F., Yin S.C., Yang D.M. & Cheng S.F.** Comparison of polymerase chain reaction, monoclonal antibody based enzyme immunoassay and cell culture for detection of *Chlamydia trachomatis* in genital specimens. *Sex. Transm. Dis.*, 1992, 19: 193-197.
- Youle M.M., Hawkins D.A., Collins P., Shanson D.C., Evans R., Oliver R. & Lawrence A.** Aciclovir-resistant herpes in AIDS patients treated with Foscarnet. *Lancet*, 1988, 2: 341-342.
- Younes M.S., Robertson E.M.E. & Bencosme S.A.** Electron microscope observations on Langerhans cells in the cervix. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1968, 102: 397-403.
- Zagury D.J., Benard J., Leibowitch J., Safai B., Groopman J.E., Feldman M., Sarngadharan M.G. & Gallo R.C.** HTLVIII in cells cultured from semen of two patients with AIDS. *Science*, 1984, 226: 449-451.
- Zambruno G., Mori L., Marconi A., Mongiardo N., De Rienzo B., Bertazzoni U. & Giannetti A.** Detection of HIV-1 in epidermal Langerhans cells of HIV-infected patients using polymerase chain reaction. *J. Invest. Dermatol.*, 1991, 96: 979-982.
- Zorr B., Schäfer A.P.A., Dilger I., Habermehl K.O. & Kosh M.** HIV-1 detection in endocervical swabs and mode of HIV-1 infection. *Lancet*, 1994, 343: 852.

Annexes

VIII^{ème} CONFERENCE INTERNATIONALE SUR LE SIDA EN AFRIQUE

&

VIII^{ème} CONFERENCE AFRICAINE SUR LES MST



DIAGNOSTIC DIRECT DE *T. VAGINALIS* PAR
REACTION D'AMPLIFICATION EN CHAÎNE (PCR)

P. KENGNE, F. VEAS, N. VIDAL, M. DOSSO*, J.L. REY, G. CUNY.

Laboratoire Rétrovirus Parasites ORSTOM, Montpellier, France.*Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.

Objectif : La détection et l'identification des agents infectieux souffrent encore d'un manque de moyens techniques sensibles en dépit du grand nombre des méthodes diagnostiques existantes, posant par conséquent la question d'évaluation épidémiologique et clinique. Il convient de souligner aussi les difficultés d'obtenir les PCR positives à partir d'échantillons cliniques des sujets peu parasités. Des travaux récents montrent que *T. vaginalis* est un facteur favorisant dans la transmission du VIH. L'objectif principal de notre étude est d'établir une méthode de diagnostic par PCR de *T. vaginalis*, spécifique et sensible.

Méthodes : Pour obtenir une bonne sensibilité de détection, nous avons choisi comme cible, des séquences répétées du parasite. L'ADN de 5 souches référencées de *T. vaginalis* (Hôpital Charles Nicolle de Rouen, France et ATCC, USA) isolées à partir des patients présentant des signes cliniques de la trichomonase a été utilisé dans cette étude. Après clonage et séquençage d'un fragment répété de 2-kb, présent dans la souche 30001 d'ATCC, nous avons déterminé des amorces dans les régions les plus conservées à l'intérieur de ce fragment pour effectuer les réactions de PCR sur les prélèvements urogénitaux des consultants pour MST (Hôpital d'Instruction des Armées Begin de St Mandé, France et l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire).

Résultats : Les analyses RFLPs montrent, par hybridation, la présence du fragment cloné de 350-bp dans des génomes de 5 souches de *T. vaginalis*. Les amorces choisies ont permis d'effectuer d'une part les tests de sensibilité de la PCR sur les souches en culture et également de détecter *T. vaginalis* dans des prélèvements vaginaux des femmes infectées par ce parasite (20 cas). Pour les patients présentant seulement des signes cliniques de la trichomonase et chez qui cet agent n'avait jamais été détecté par microscopie, nous avons pu mettre en évidence l'ADN du parasite dans 3 cas sur 5.

Conclusion : Cette stratégie nous a permis d'amplifier par PCR des fragments d'ADN de *T. vaginalis* à partir d'échantillons cliniques provenant des patients asymptomatiques chez qui la détection du parasite n'avait pas été possible par d'autres méthodes. Cette méthodologie devrait permettre de mieux évaluer les prévalences de la trichomonase associée au SIDA et surtout aider à effectuer des traitements prophylactiques chez des patients à risque pour la transmission du VIH.



Relation between human immunodeficiency virus and sexually transmitted diseases : Contribution of diagnosis and viral quantification tools based on molecular biology methods for the study of sexual transmission of HIV.

Summary

The study presented in this thesis is a part of a project which the objective is to identify and evaluate factors and their impact on sexual transmission of HIV among African populations.

We have focused our research on diagnosis (based on PCR method, of non-ulcerative sexually transmitted diseases because of the high prevalence rate of these infections among at risk individuals for HIV and because of lack of sensitive and specific existing method. In addition of some factors as, level of immune response and local cervicovaginal infection, the sexual transmission of HIV is conditioned by the presence of virus in cervicovaginal secretions. Therefore, we have developed a method for detection of HIV in cervicovaginal secretions and virus quantification in the plasma and in these secretion samples. In the aim to evaluate the influence of wide spread non-ulcerative STD on the sexual transmission of HIV, we analysed the technical and methodological feasibility using molecular biology tools developed.

In the first time, we have developed sensitive and specific genomic methods to detect and identify asymptomatic infections using cervicovaginal specimens. A PCR and a probe for *Trichomonas vaginalis* diagnosis had been established from repeated DNA sequences. When undergoing the establishment of this diagnosis method, sequences revealed for the first time, the presence of a TGG microsatellite within protozoa. In the second hand with the collaboration of Innogenetics (Belgium), we have developed and evaluated a simultaneous detection method for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* using "Line Probe Assay" (LiPA) in the aim of commercialisation.

In the following, we have also developed a viral quantification method, for plasma and cervicovaginal samples of patients infected with different HIV type, using competitive and non-competitive PCR.

We easily detected virus nucleotide sequence in cervicovaginal secretions of seropositive individuals infected by at least one STD. This result confirms the reality of the biological association between STD and HIV, the potential role of these STD on the enhancement of HIV in cervicovaginal area and then increased infectivity of HIV infected women.

Key words : STD, HIV, Sexual transmission, Diagnosis, PCR, Viral quantification, Line Probe Assay, coinfection.

Résumé

Le travail présenté dans cette thèse entre dans le cadre général d'un projet dont l'objectif est d'identifier et d'évaluer l'impact des facteurs influençant la contagiosité sexuelle du VIH dans plusieurs populations africaines.

Nous avons porté notre attention sur le diagnostic (par des méthodes dérivées de la PCR) des maladies sexuellement transmissibles (MST) de type inflammatoire, parce que d'une part elles constituent des facteurs de risque, très importants par leur prévalence, et d'autre part parce que les méthodes de diagnostic existantes n'étaient pas appropriées pour une telle étude.

En dehors d'autres facteurs, comme la réponse immunitaire de l'hôte et les infections locales cervico-vaginales, la contagiosité sexuelle du VIH est conditionnée par la présence du virus dans l'aire génitale. Il nous a paru important de développer des méthodes de détection du virus dans les sécrétions cervico-vaginales, et des méthodes d'évaluation de la charge virale, aussi bien dans le plasma que dans ces mêmes sécrétions. Afin d'appréhender l'influence des MST non-ulcératives les plus répandues sur la contagiosité sexuelle du VIH, une étude de faisabilité technique et méthodologique avec les outils de biologie moléculaire que nous avons développés a été réalisée.

Dans un premier temps, nous avons développé des outils génétiques de diagnostic sensibles et spécifiques, permettant en particulier de détecter et d'identifier les agents de cas d'infection asymptomatiques, à partir de prélèvements cervico-vaginaux. Un diagnostic par PCR et sonde ADN, établi à partir des séquences répétées, a été mis au point pour *Trichomonas vaginalis*. Au cours du développement de ce diagnostic, nous avons mis en évidence, pour la première fois, une séquence microsatellite chez un protozoaire. En partenariat avec Innogenetics (Belgique), nous avons développé et évalué le concept d'une détection simultanée de *Chlamydia trachomatis* et de *Neisseria gonorrhoeae* et leur identification, par la méthode "Line probe assay" (LiPA), destinée à être commercialisée. Avec ces méthodes, nous avons largement amélioré le diagnostic classique.

Par la suite, nous avons également mis au point des méthodes de quantification virale applicables au plasma et aux prélèvements cervico-vaginaux des patientes infectées avec différentes souches du VIH, par la PCR compétitive ou non compétitive en système cellulaire et plasmidique.

Nous avons observé une fréquence élevée de détection des séquences nucléotidiques virales libres et intégrées, dans les sécrétions cervico-vaginales de personnes séropositives infectées par une ou plusieurs MST. Ces résultats réaffirment la réalité biologique d'une association entre le VIH et les MST non-ulcératives.

Mots-clé : MST, VIH, contagiosité sexuelle, diagnostic, PCR, charge virale, LiPA, co-infections.