



LYON, DU 10 AU 12 JUIN 2009

Nouvelles voies de prévention de l'infection HIV : Place des microbicides

Bruno POZZETTO

GIMAP, EA3064

Université de Saint-Etienne



Plan de la présentation

- Transmission cervico-vaginale de l'infection par HIV
- Molécules à visée microbicide
- Du rêve à la réalité ...
- Evaluations in vitro, ex vivo et chez l'animal
- Questions en suspens



Plan de la présentation

- **Transmission cervico-vaginale de l'infection par HIV**
- Molécules à visée microbicide
- Du rêve à la réalité ...
- Evaluations in vitro, ex vivo et chez l'animal
- Questions en suspens



Rationnel

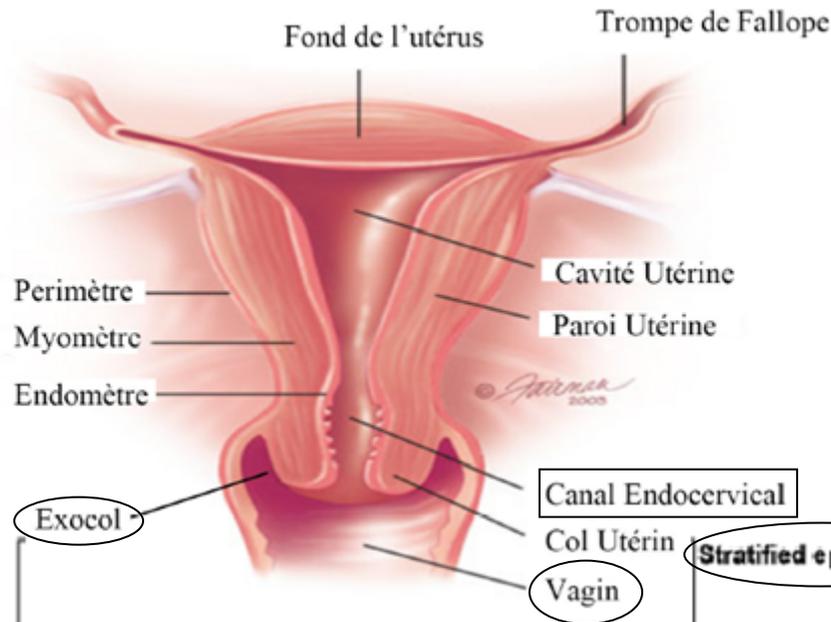
- En 2006 : 4,3 millions de nouvelles infections (~ 11 000 / jour)
- > 50% des 39,5 millions d'adultes vivant avec HIV/SIDA sont des femmes
- En Afrique sub-Saharienne : prévalence 3 x plus élevée chez les femmes que chez les hommes dans la tranche d'âge 15 - 24 ans
- Majorité des infections acquises par rapport sexuel non protégé
- Nécessité d'un moyen de prévention contrôlé par la femme (≠ préservatif, circoncision)

Because the virus can be transmitted by sexual activity, which is a fundamental component of human behavior, it isn't going to be easy to shut it off.

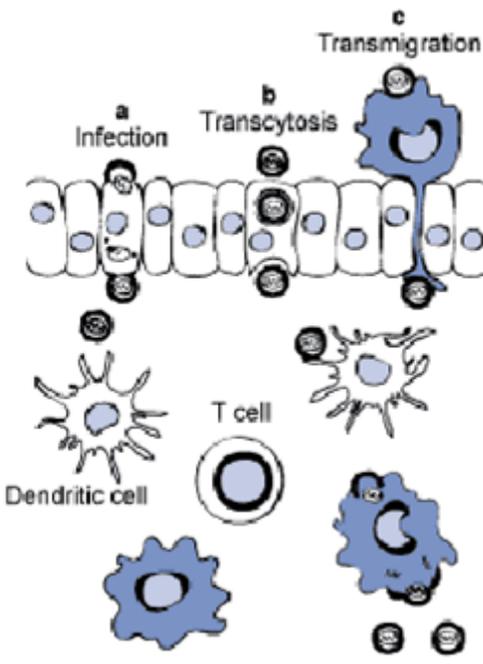
Anthony Fauci, 2007

If they can put a man on the moon, why can't they make something we can use to protect ourselves from HIV?

Une éducatrice, Ouganda, 1993



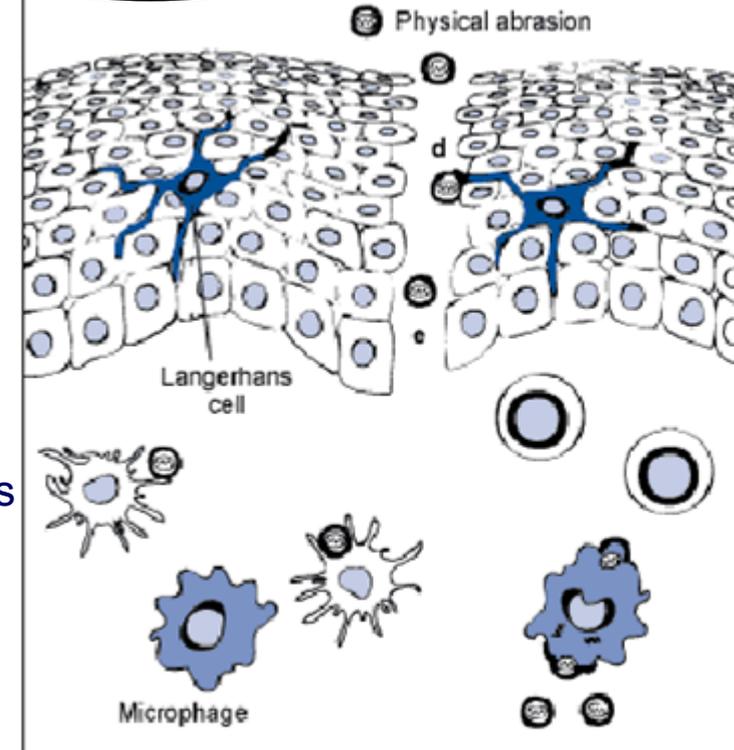
Columnar epithelium



- a. Direct infection
- b. Transcytose
- c. Transmigration via infected donor cells
- d. Infection of intraepithelial Langerhans cells
- e. Circumvention of the epithelial barrier through physical breaches

R. Shattock, Nat Rev Immunol, 2003

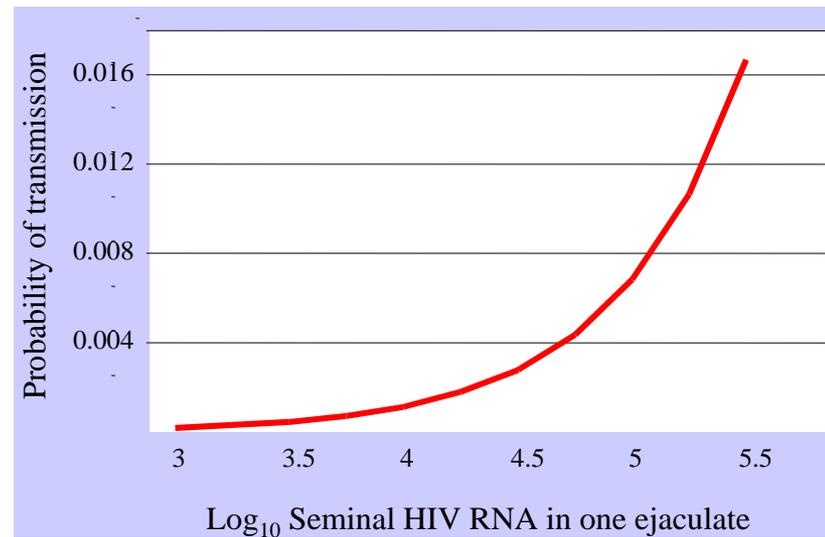
Stratified epithelium



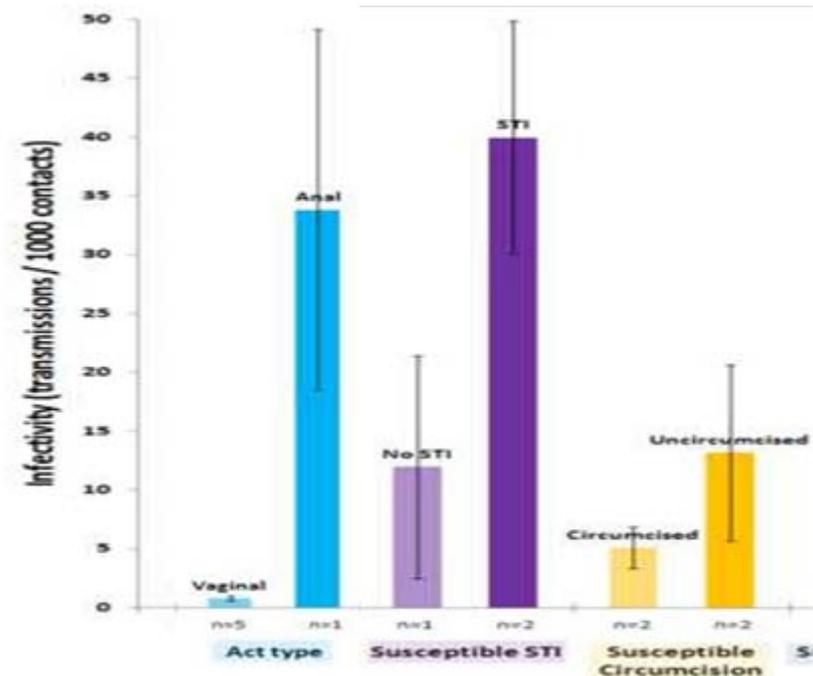
Facteurs influençant la transmission sexuelle de HIV

La transmission sexuelle est souvent estimée aux environs de 1 acte sexuel pour 500 à 1000 mais cette proportion peut être considérablement augmentée en cas de :

- charge virale élevée dans le sperme
- relation anale
- IST associée
- absence de circoncision



Chakraborty et al., AIDS 2001

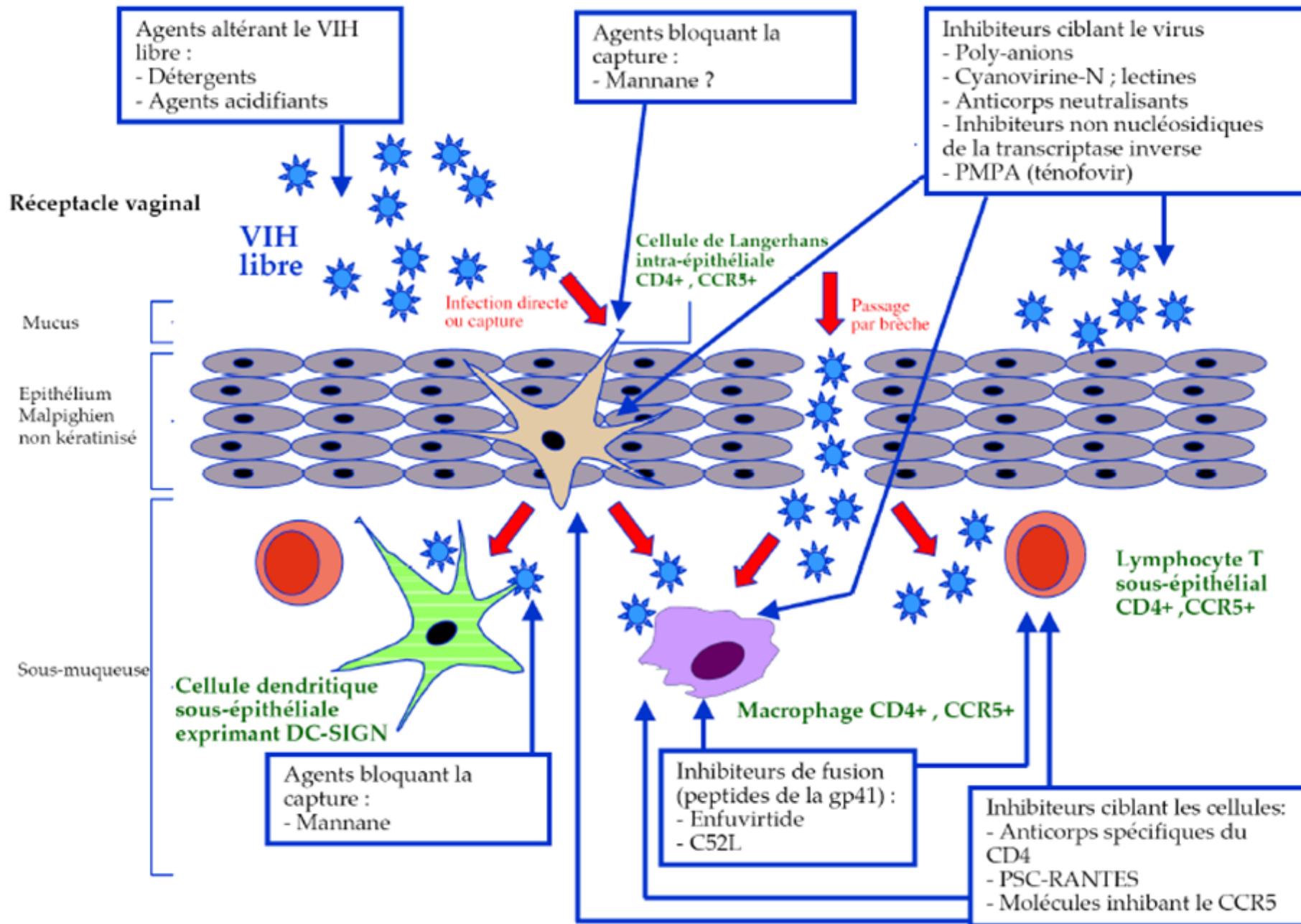


Powers et al Lancet ID, 2008

Plan de la présentation

- Transmission cervico-vaginale de l'infection par HIV
- **Molécules à visée microbicide**
- Du rêve à la réalité ...
- Evaluations in vitro, ex vivo et chez l'animal
- Questions en suspens





Cinq classes = cinq stratégies

(d'après B. Cutler & J. Justman, *Lancet*, 2008, 8, 685-97)

- **Surfactants (destruction non spécifique des membranes cellulaires et microbiennes)**
 - Nonoxinol-9 (nonoxynol-9)
 - C31G (Savvy)
 - Sodium lauryl sulfate (Invisible condom)
- **Protecteurs du milieu vaginal (acidifiants)**
 - Carbopol 974P (BufferGel)
 - Acidform (Amphora)
- **Inhibiteurs d'entrée non spécifiques de HIV : polymères anioniques**
 - Naphtalene sulfonate (PRO2000)
 - Carageenan (Carraguard/PC-515)
 - Cellulose sulfate (Ushercell)
 - Cellulose acetate phtalate (CAP)
 - Dendrimers = SPL7013 (Vivagel)

- **Inhibiteurs d'entrée spécifiques de HIV**
 - Inhibiteurs de gp120 (cyanovirine-N, lectines de plantes)
 - Inhibiteurs de gp41 (enfuvirtide ou T20, T1249)
 - Inhibiteurs de CD4 (anticorps neutralisants, miniprotéines CD4)
 - Inhibiteurs de CCR-5 (Maraviroc, analogues de RANTES)
 - Inhibiteurs de l'infection des cellules dendritiques (Acs anti-DC-SIGN, mannane)
- **Inhibiteurs de la polymérase de HIV**
 - Nucléotidiques (Tenofovir gel/PMPA)
 - Non nucléosiques (TMC120, UC781, DABO, MIV150)

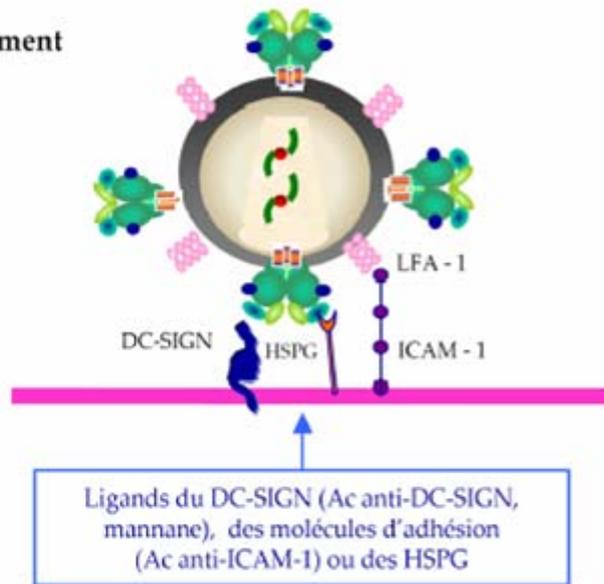
+ *Combinaisons*

- *INNTI/Polyanion (PC815)*

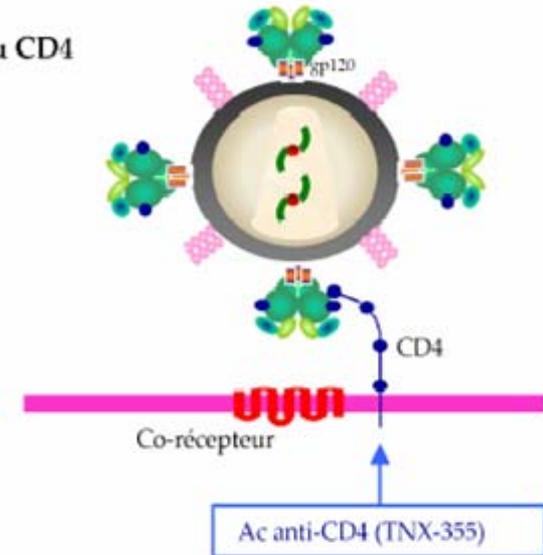
- *INNTI/bloqueurs de CCR5*

+ *Mode d'action inconnu (e.g. Praneem)*

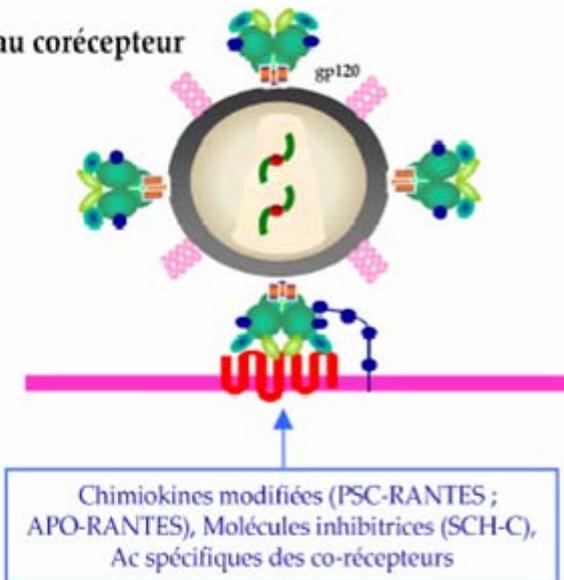
A. Attachement



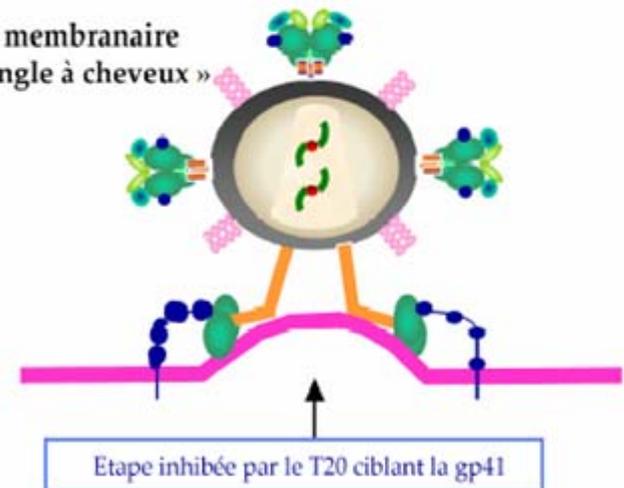
B. Liaison au CD4



C. Liaison au corécepteur



D. Fusion membranaire avec « épingle à cheveux »



Nouvelles approches

Protéines et peptides recombinants (production possible par fermentation à faible coût)

PSC-Rantes : très forte activité anti-HIV in vitro et très actif chez le macaque mais coûteux à produire

Anticorps monoclonaux

Anticorps à un seul domaine (fabriqués chez le lama) : production facile à grande échelle par fermentation

Microbicides produits par des bactéries recombinantes (lactobacilles) ou des plantes génétiquement modifiées ...

"RNA silencing" (petits ARN interférents)

Exemple récent : anticorps monoclonal anti-gp120 Mab b12 produit dans une plante transgénique + cyanovirine M + protéine de fusion des deux précédentes exprimée dans une plante transgénique
(Sexton et al., *FASEB J*, May 2009)

DIFFERENTES FORMULATIONS

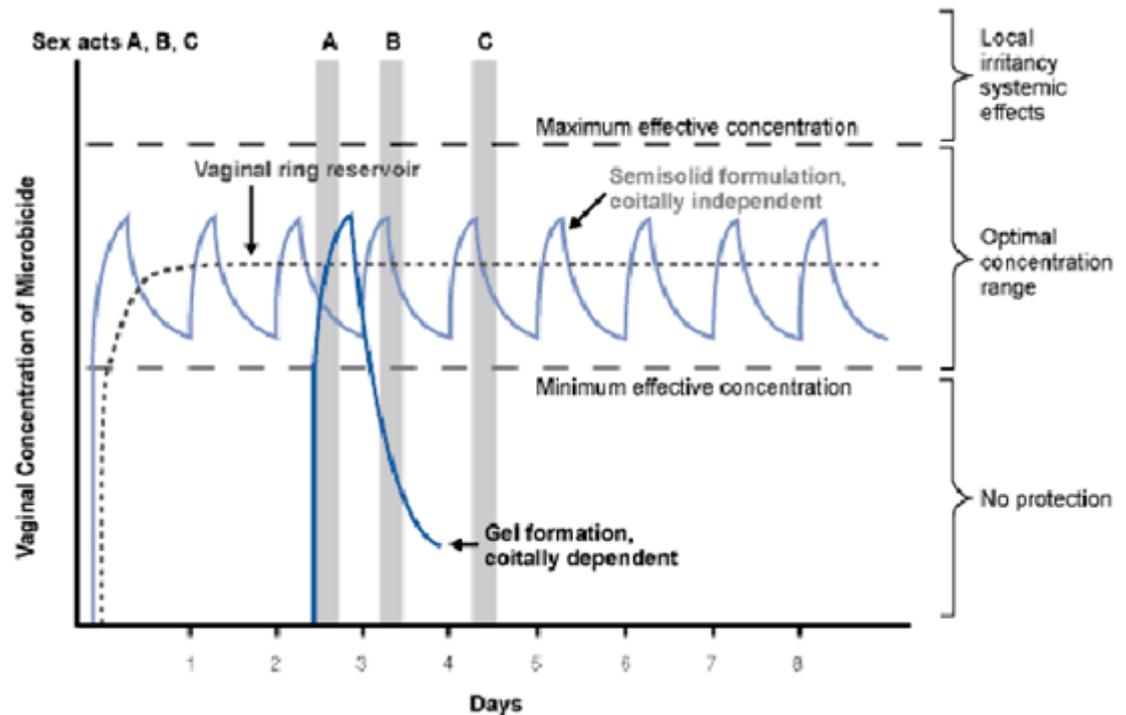
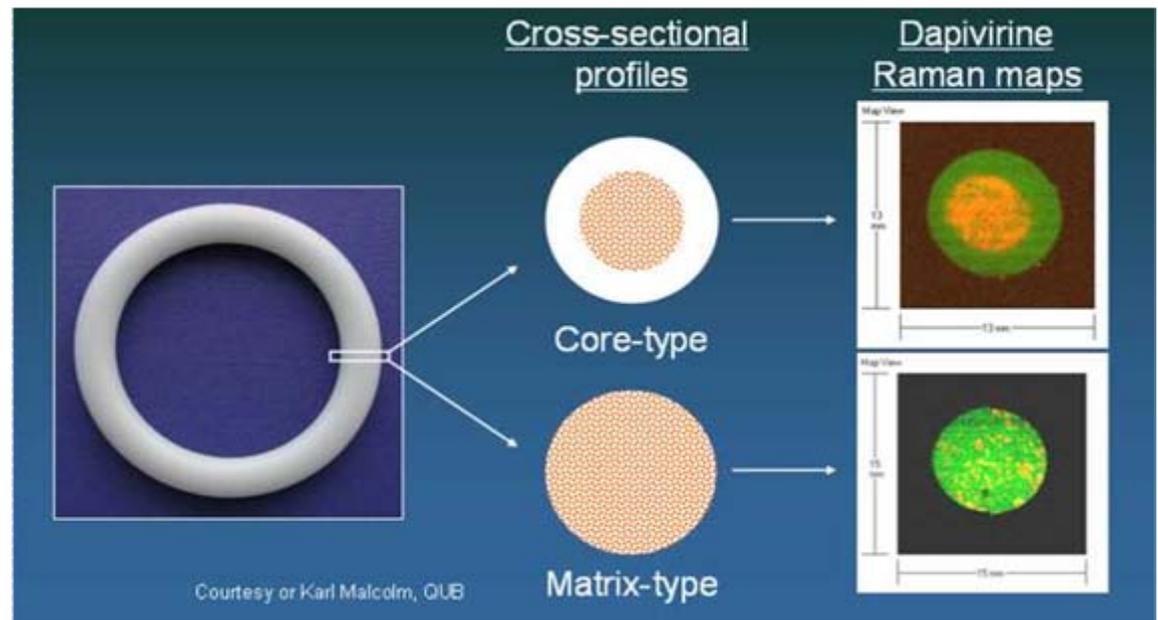
- Gel : moyen le plus couramment utilisé
 - **avantages :**
 - bon marché
 - grande quantité de produit sous un faible volume
 - bonne stabilité
 - utilisable avec des molécules non solubles
 - facilité de stockage
 - **inconvénients :**
 - risque de fuite
 - administration à chaque rapport et durée de protection limitée
 - difficulté d'utilisation à l'insu du partenaire masculin



Tenofovir Gel



- Autres présentations
 - anneaux vaginaux
 - films en polymères qui se dissolvent après mise en place au niveau vaginal
 - intérêt : libération progressive de produit (24 heures ou plus)



Plan de la présentation

- Transmission cervico-vaginale de l'infection par HIV
- Molécules à visée microbicide
- **Du rêve à la réalité ...**
- Evaluations in vitro, ex vivo et chez l'animal
- Questions en suspens



LE MICROBICIDE IDEAL (d'après G. Vanham)

- Prevent viral integration
- Nanomolar antiviral activity
- Large therapeutic index (> 1000)

- Active against prevalent HIV-1 subtypes (and SHIV)
- Active against cell-free and cell-associated virus
- Active in the presence of biological fluids (CVF, semen)

- By preference also active post-exposure
- By preference no induction of cross-resistance with first and second line therapy

IMPACT D'UN MICROBICIDE AVEC 60% D'EFFICACITE

IF USED...

in 50% of sexual encounters without condoms
by 20% of people reachable through existing health services (as of 2002)

WITHIN THREE YEARS, WOULD

prevent 2.5 million new infections
save US\$2.7 billion in care and treatment of HIV/AIDS patients and their families
save US\$1 billion reduction in productivity losses due to AIDS

Clinical sites supported for current or potential microbicide research*

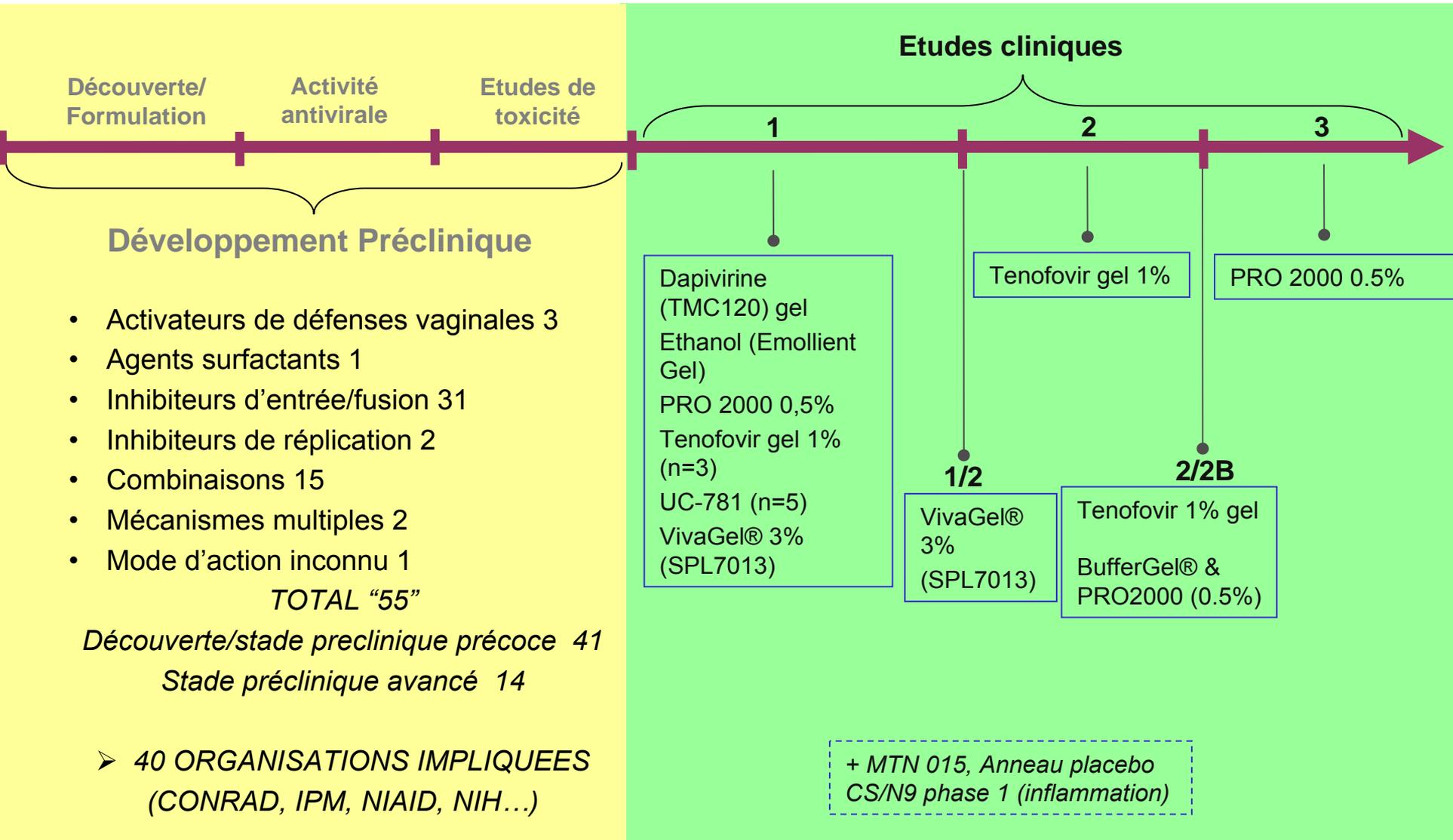
COUNTRY	SITES
Australia	Melbourne Sexual Health Centre
Belgium	Institute of Tropical Medicine, SGS Biopharma Research Unit
Benin	Centre National Hospitalier Universitaire, Projet SIDA 3
Botswana	BOTUSA Project
Ethiopia	Addis Ababa University
India	Jehangir Hospital, NARI/ICMR, St. John's Medical College, YRG Care
Kenya	Kenya Medical Research Institute (KEMRI)
Malawi	Lilongwe Central Hospital, Queen Elizabeth Central Hospital
Madagascar	Centre National de Recherche sur l'Environnement (CNRE), University of Antananarivo
Mozambique	Manhiça Health Research Center (CISM) Mavalane Hospital, Maputo
Nigeria	National Institute for Medical Research (NIMR/Nigeria), University of Ibadan, University of Port Harcourt
Rwanda	Projet Ubuzima
South Africa	Africa Centre for Health and Population Studies (ACHPS), CAPRISA, Farmovs-Parexel Clinical Pharmacology Research Unit, Medical Research Council HPRU, Orange Farm Clinic, RK Khan Hospital, University of Cape Town, University of KwaZulu-Natal, University of Limpopo/MEDUNSA, University of the Western Cape, University of the Witwatersrand RHRU
Tanzania	African Medical and Research Foundation (AMREF), Kilimanjaro Reproductive Health Project, London School of Hygiene and Tropical Medicine (LSHTM), National Institute for Medical Research (NIMR/Tanzania)
Thailand	Chiang Rai Health Club
Uganda	Makerere University Faculty of Medicine, Uganda Virus Research Institute (UVRI)
UK	St. Mary's Hospital
US	Baystate Medical Center, Bronx-Lebanon Hospital Center, California Family Health Council, Columbia University, Eastern Virginia Medical School, Emory University, Johns Hopkins Bayview Medical Center, New York University, Ohio State University, Oregon Health and Science University, University Hospitals of Cleveland, University of Alabama at Birmingham, University of California San Francisco, University of Cincinnati, University of Colorado at Denver, University of Pennsylvania, University of Pittsburgh Medical Center, University of Texas Southwestern Medical Center
Zambia	Kamwala Health Centre, University Teaching Hospital
Zimbabwe	Seke South Clinic, University of Zimbabwe

TABLE 2 MICROBICIDE CLINICAL RESEARCH SITES AS OF FEBRUARY 2007



Academic Medical Center, University of Amsterdam (AMC)
 Adolescent Medicine Trials Network (ATN)
 Centre for the AIDS Programme of Research in South Africa (CAPRISA)
 Centers for Disease Control and Prevention (CDC)
 CONRAD
 European and Developing Countries Clinical Trials Partnership (EDCTP)
 Fogarty International Center (FIC)
 International Partnership for Microbicides (IPM)
 London School of Hygiene and Tropical Medicine (LSHTM)
 Microbicide Trials Network (MTN)
 Microbicides Development Programme (MDP)
 National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIH/NAID [DAIDS and DMID])
 National Institute of Child Health and Human Development (NIH/NICHD)
 Population Council
 Medical Research Council, South Africa (MRC/ZA)
 Medical Research Council, United Kingdom (MRC/UK)
 Wellcome Trust
 World Health Organization (WHO)

Microbicides dans le “pipeline”



Leçons des échecs d'essais cliniques ...

Toxicité

- ✓ **Nonoxynol 9** (*Van Damme et al, Lancet, 2002*)
 - Début de l'essai en 1992 (*Kreiss et al, JAMA*)
 - Toxicité décrite dès 1964! (*Rovinsky et al, Obstet Gynecol*)

TABLE 1. In Vivo and Ex Vivo Toxicity of N-9

Anti-HIV Activity	Cytotoxicity	Selectivity	Cell Type	Reference
IC ₁₀₀ : 0.05%	CC ₅₀ : 1%	SI: 20.00	Lymphocyte	Hicks et al, 1985 ¹⁴
IC ₁₀₀ : 0.05%	CC ₅₀ : 0.5%	SI: 20.00	Lymphocyte	Malkovsky et al, 1988 ¹⁵
IC ₁₀₀ : 0.01%	CC ₅₀ : 0.01%	SI: 1.00	Lymphocyte	Bourinbaïar and Lee-Huang, 1994 ²²
IC ₁₀₀ : 0.05%	CC ₅₀ : 0.02%	SI: 0.40	Lymphocyte	Harrison and Chantler, 1998 ²³
IC ₅₀ : 0.0005%	CC ₅₀ : 0.0006%	SI: 0.12	HeLa epithelial cells	Krebs et al, 1999 ²⁴
IC ₅₀ : 0.0005%	CC ₅₀ : 0.0005%	SI: 0.10	Cervical explants	Shattock, unpublished

CC indicates cytotoxic concentration; IC, inhibitory concentration.

- ✓ **SAVVY (C31G)**

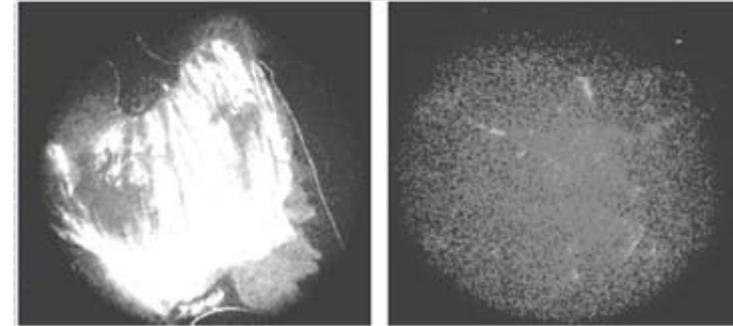
Inefficacité

- ✓ **Cellulose sulfate** (*Tao et al, 2008 AIDS Res Hum Retroviruses*)

- Effet inhibiteur du sperme
- ↑perméabilité et de l'inflammation *in vitro*
- action préférentielle sur souches CXCR4

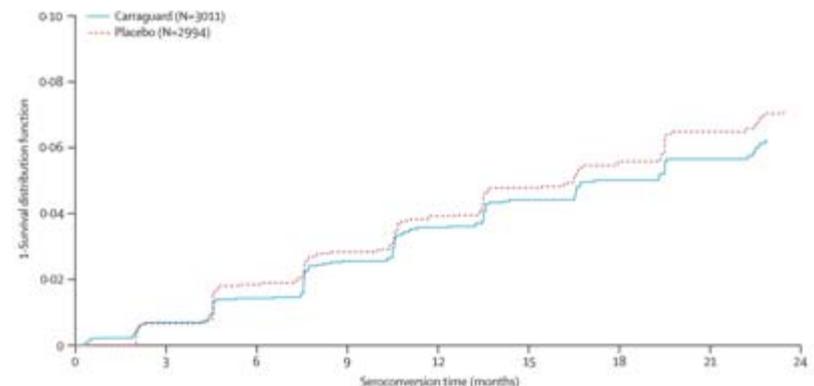
- ✓ **Carraguard** (*Skoler-Karpoff et al., Lancet., 2008*)

- Problèmes de compliance
- Discordances *in vitro* / *in vivo*



« ... in the case of N-9, much of the information we know on a preclinical basis was obtained while clinical trials were ongoing... »

(*Hillier et al, J Acquir Immun Defic Syndr 2005: The story of Nonoxynol 9*)

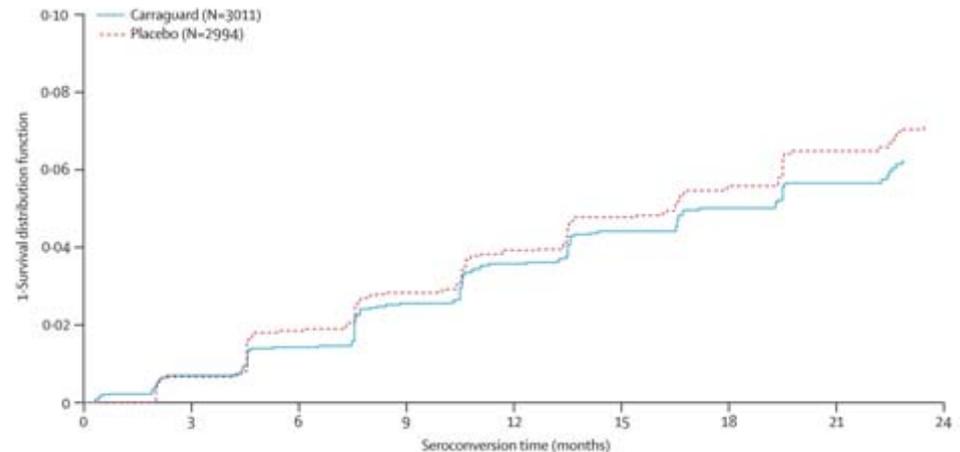


Etude Carraguard phase 3

- Composition : dérivé d'algue (utilisé dans l'alimentation et les cosmétiques)
- Spectre : actif in vitro sur HIV - actif aussi sur HSV-2, HPV, gono
- Propriétés : non contraceptif - compatible avec préservatif - sans goût ni odeur - bon marché - non irritant
- Design de l'étude : randomisé - double aveugle - versus placebo
 - étudié en association avec préservatif
 - effet requis minimal de 33% pour une différence significative
 - effectif : 6639 sujets sur 3 ans (Mars 2004-2007)
 - participation : 9 mois à 2 ans
 - population : sexuellement active - 16-40 ans -HIV négatives
 - 3 centres en Afrique du Sud
- Caractéristiques de la population :
 - moyenne d'âge = 30,7 ans
 - > 99% noirs
 - 63% célibataires
 - % HIV + à l'inclusion : 18 -24 - 43% selon les centres

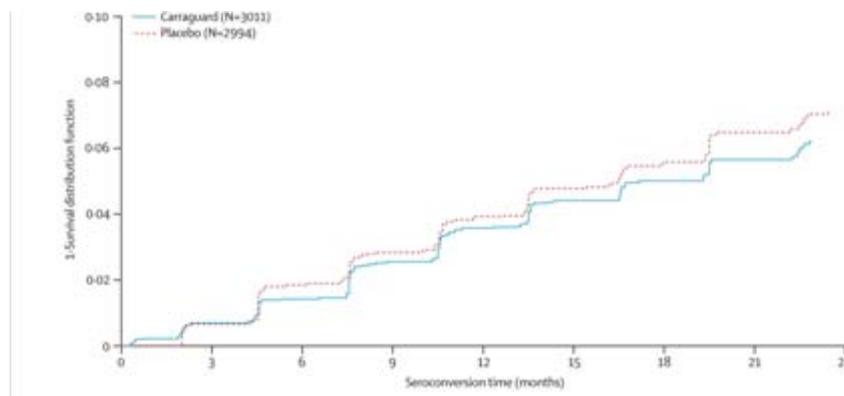
Etude Carraguard phase 3

- Evaluation de l'observance
 - par retour des applicateurs : 61%
 - par application d'une substance qui se colore si le gel a été utilisé
Carraguard = 43,4% - placebo = 45,4%
- Autres caractéristiques : 64% d'utilisation du préservatif - sexe oral = 8% - sexe anal : 2%
- **SEROCONVERSION HIV : pas de différence en intention de traiter**
 - **134 (3,4%) dans groupe Carraguard**
 - **145 (3,8%) dans groupe placebo**
- Evènements indésirables :
 - sévères : 2 versus 3
 - autres : 22 versus 23
- Autres IST :
 - chlamydia : 10 versus 12
 - gonocoque : 7 versus 9
 - trichomonas : 7 versus 9
 - NB : risque de séroconversion HIV accru de 70% si IST



Prevention of the Sexual Transmission of HIV-1: Results from Randomized Controlled Trials

Intervention	RCTs Completed	RCTs Effective
Behavior change	9	0
Circumcision	4	3
Diaphragms	1	0
Microbicides	9.5	0
PrEP	1	0
STD Treatment	7	1
Vaccines	2	0

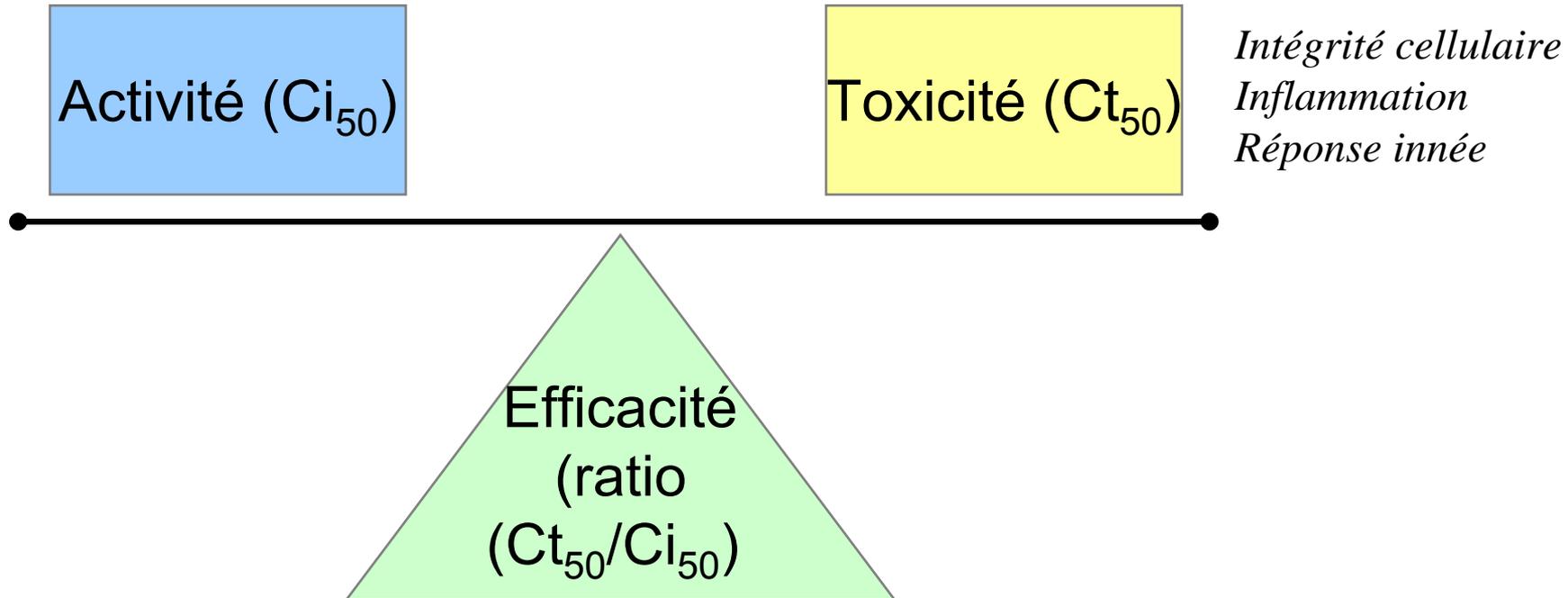


Plan de la présentation

- Transmission cervico-vaginale de l'infection par HIV
- Molécules à visée microbicide
- Du rêve à la réalité ...
- **Evaluations in vitro, ex vivo et chez l'animal**
- Questions en suspens



Balance Toxicité/Activité



La rupture de l'intégrité de l'épithélium, l'augmentation de l'inflammation ou l'inhibition de la réponse innée augmente le risque de transmission de HIV

Evaluation préclinique des composés en phase d'essais cliniques

Produit (phase)	Efficacité		Toxicité	
	<i>In vitro/ex vivo</i>	Modèle animal	<i>In vitro/ex vivo</i>	Modèle animal
<u>PRO 2000 0,5% (1, 3)</u> <i>Indevus Pharmaceuticals</i>	Cell-free, -associated, fusion assays, explants, sperme, pH (Lackman-Smith et al, 2008): ↓ <u>si sperme</u>	Macaque (Weber et al., 2001; Patton et al, 2008) Souris, HSV (Patel et al, 2007): ↓ <u>si sperme</u>	CaCo2 (Dezzutti et al, 2004) Explants CV (Cummins et al, 2007): <u>toxicité (4%)</u>	Macaque (Patton et al, 2008): <u>toxicité à 2 et 4%</u> Souris, HSV, (Galen et al, 2007): ↑ <u>trans. cytokines</u>
<u>SPL7013 3% (1, 1/2)</u> <i>Starpharma</i>	Cell-free, -associated, fusion assays, explants, semen, pH (Lackman-Smith et al, 2008): ↓ <u>si sperme</u>	Macaque (Patton et al, 2008)	Explants CR (Abner et al, 2005): ↓ <u>épithélium</u>	Macaque (Patton et al., 2008): <u>toxicité à 5%</u>
<u>Tenofovir 1%(1, 2/2B)</u> <i>CONRAD (Gilead)</i>	Explants CR (Fletcher et al, 2006) MO-DC/CD4+T (Terrazas-Aranda et al, 2007)	Macaque (Patton et al, 2008)	Explants CR (Fletcher et al, 2006)	Macaque (Patton et al, 2007; Cranage et al., 2008)
<u>TMC120 (1)</u> <i>IPM</i>	Explants CV et CR (Fletcher et al, 2006&2008) MO-DC/CD4+T (Terrazas-Aranda et al, 2007)	Souris (Di Fabio et al, 2003)	Explants CV et CR (Fletcher et al, 2006&2008)	Lapin, « slug test » (Dhondt et al, 2005)
<u>UC781 (1) 0,1-0,25%</u> <i>CONRAD</i>	Explants CV et CR (Fletcher et al, 2005&2006) MO-DC/CD4+T (Terrazas-Aranda et al, 2007)	ND	Explants CV et CR (Fletcher et al, 2005&2006)	Macaque (Patton et al, 2007): ↑ <u>cytokine (1%)</u>

Recommandations de l'International Working Group on Microbicides (2004)

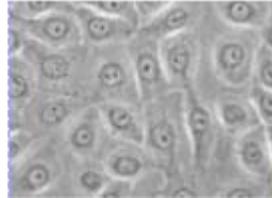
- **Tests d'activité vis-à-vis de HIV**
 - ✓ *Utilisation de souches virales de tropisme CXCR4 et CCR5*
 - ✓ *Tests sur un large panel de cellules et d'isolats primaires à différentes dilutions (avec des souches d'origine séminale)*
 - ✓ *En présence de sperme, de sécrétions cervico-vaginales, de différents pH*
 - ✓ *Etude des mécanismes d'action dans différents modèles in vitro*
 - ✓ *Evaluation des excipients séparément*
- **Tests d'activité sur d'autres agents de MST**
- **Tests de toxicité**
 - ✓ *Flore vaginale (in vitro et modèle macaque)*
 - ✓ *Modèle lapin d'irritation vaginale (10 j)*
- **Activité spermicide, études de toxicologie, pharmaco-cinétique, mutagénèse, tolérance...**

Tests de toxicité *in vitro* et *ex vivo* (explants)

• Cellules épithéliales

✓ Tractus génital

- *Immortalisées* (VK-2, Ect1, End1)
- *Carcinomateuses* (HEC1-A, HeLa, Me180)
- *Primaires* (P-Vag, HVK)



✓ Rectales (Caco-2, SW837)

• Cellules immunitaires

✓ Tumorales (MT-2, SupT, H9, U-937)

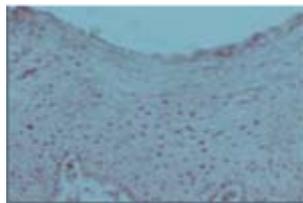
✓ Primaires (PBMCs, Macrophages, LyT)

• Explants tissulaires

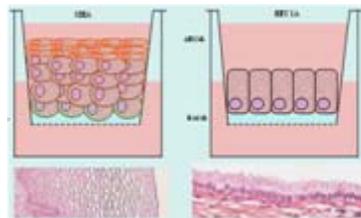
✓ Cervicaux, vaginaux

✓ Prépuce, pénis

✓ Colorectal



• Modèles « dual-chamber »



• Tests

✓ Viabilité cellulaire (cytotoxicité)

✓ Perméabilité membranaire (TEER)

✓ (Bio)marqueurs

▪ d'inflammation

» *Cytokines* (IL-1, IL-6, TNF- α)

» *Chemokines* (IL-8, MIP, RANTES)

» *Facteurs de transcription* (NF κ B, AP-1)

» *Médiateurs* (PGs, VEGF, MPO)

▪ immunité innée

(defensins, SLPI, Lf, gp340)

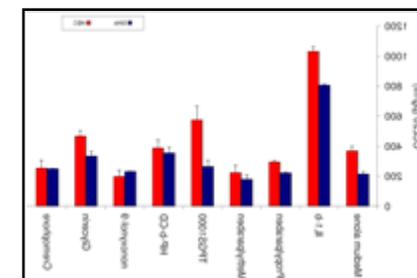
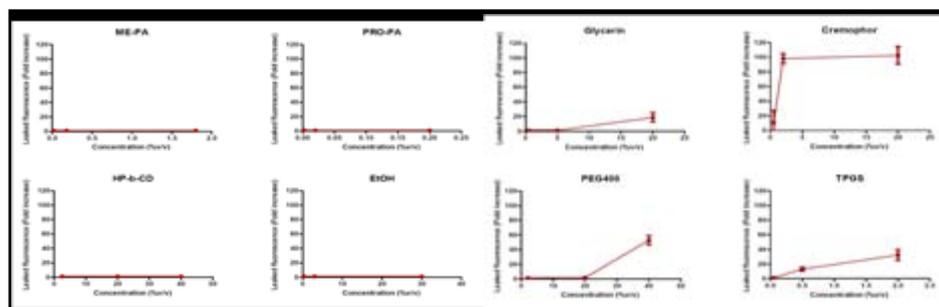
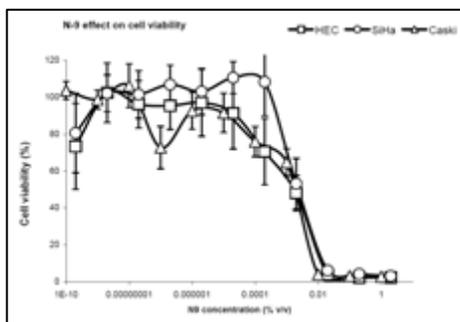
✓ Flore vaginale

▪ *Lactobacillus jensenii*

▪ *Lactobacillus crispatus*

Compound	Cellular toxicity ¹	CCL-20 secretion ²	Increase of epithelial permeability ³
Nonoxynol 9	High	Decrease	High
Methyl paraben	Discrepant results	Decrease	None
Propyl paraben	Discrepant results	No effect	None
Ethanol	Moderate	No effect	None
Glycerin	Moderate	No effect	Moderate
PEG 400	Moderate	No effect	Moderate
Cremophor EL	High	No effect	High
TPGS 1000	High	No effect	High
HP- β -CD	No effect	Increased	None

¹ Assessed by both WST-1 and XTT assays; ² compared to the effect of medium only on HEC1-A; ³ High: decrease observed at the concentration used in formulations and intermediate: decrease observed at higher concentrations.



Modèles animaux

- **Toxicité**

- ✓ Lapin (test d'irritation vaginale, 10j), souris, macaque (truie, limace)

- **Efficacité**

- ✓ Souris SCID humanisée (*Khanna et al, J Clin Invest, 1998, Di Fabio et al., 2003*)
- ✓ Macaque (SIV ou SHIV-*env*)
 - Physiologie comparable : cycle de 28j, phases folliculaire et lutéale
 - Prévention par PSC-RANTES de la transmission de SHIV (*Lederman et al, Science, 2005*)
 - Modèle NHP de transmission de SIV associé aux cellules (avec ou sans inflammation, sans traitement hormonal) (*Kaizu et al, J Infect Dis, 2006*)
 - Prévention par Tenofovir
 - Peu d'essais réalisés : développement et standardisation en cours

Plan de la présentation

- Transmission cervico-vaginale de l'infection par HIV
- Molécules à visée microbicide
- Du rêve à la réalité ...
- Evaluations in vitro, ex vivo et chez l'animal
- **Questions en suspens**



Associations de microbicides

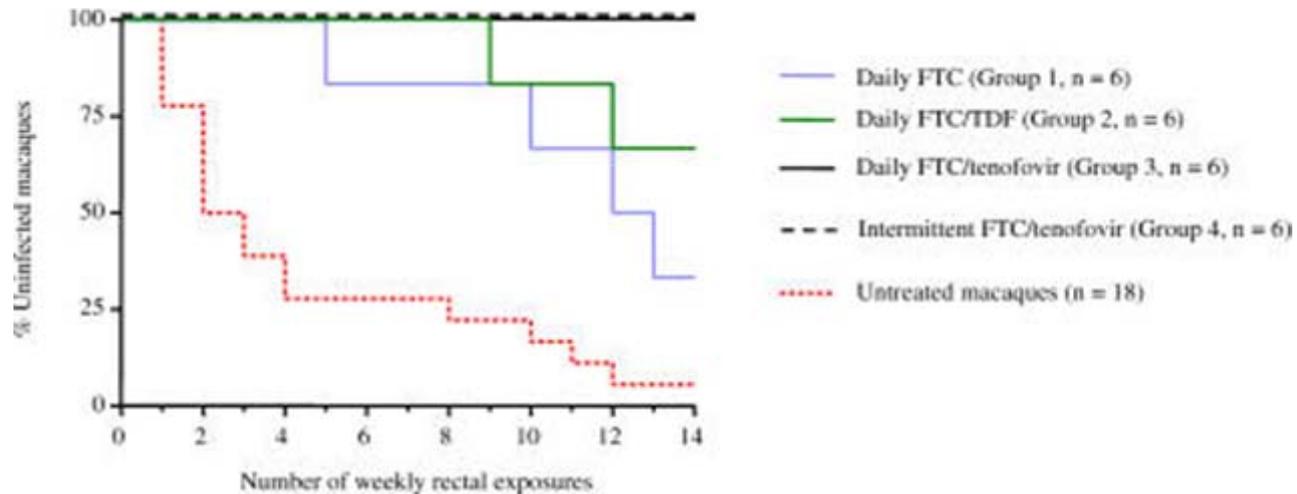
- Preuve de concept : pour la transmission mère-enfant, les associations se sont montrées supérieures aux monothérapies
- Très nombreuses combinaisons
 - de molécules (Dapivirine, Tenofovir, Maraviroc ...)
 - de modes d'administration (les anneaux vaginaux contenant dans chacune des deux moitiés une molécule différente est la solution la plus simple)
- Associations en cours d'expertise
 - UC781 (NNRTI) et Ténofovir
 - PC185 = Carraguard + MIV150 (NNRTI)
- Encore à une phase très préliminaire (problème de coût)

Microbicides et résistances

- Problème de définition : microbicide =
 - tue tous les microbes
 - tue certains agents
 - est actif sur HIV
 - n'importe quelle substance utilisée par voie vaginale ou rectale
- Différencier les traitements curatifs antiviraux (ART) des prophylaxies antivirales (ARP)
- Causes de la résistance :
 - charge virale quotidienne : 10^{11} nouveaux virions
 - billions de mutants produits chaque jour
 - une seule mutation peut suffire pour susciter une résistance
- Principes pour une ART efficaces :
 - couvrir tous les mutants pré-existants
 - exiger une CV < 50 copies/ml
 - insister sur l'observance : 3 jours sont habituellement suffisants pour voir émerger une résistance
- Règles valables pour ARP mais :
 - charge virale beaucoup plus faible dans le sperme (de l'ordre de 10^5 - 10^6)
 - une molécule peut suffire à prévenir les résistances ...

Quelques raisons d'espérer ...

- Prevention of rectal SHIV transmission in macaques by daily or intermittent prophylaxis with emtricitabine and tenofovir (Garcia-Lerma et al., Plos Medicine, 2008, e28)



- Safety and efficacy of topical vaginal microbicides BufferGel and PRO2000 in 3087 HIV-negative women from Africa and USA (Karim et al., 2009, CROI, abstract 48LB)

	N	# of HIV infections	HIV incidence per 100 person-years	Relative Risk (95% CI) vs. Placebo Gel	Relative Risk (95% CI) vs. No Gel
BufferGel	764	54	4.14	1.10 (0.75-1.62) p=0.6	1.05 (0.72-1.55) p=0.8
PRO2000	746	36	2.70	0.70 (0.46-1.08) p=0.10	0.67 (0.44-1.02) p=0.06
Placebo gel	760	51	3.91	--	0.97 (0.66-1.44) p=0.9
No gel	762	53	4.02	--	--

Perspectives - Conclusions

- Mieux connaître les mécanismes de la transmission hétérosexuelle (sélection des souches CCR5, rôle des NSMC...)
- Standardiser les essais pré-cliniques intra et inter-laboratoires Définir des biomarqueurs *in vitro* et *in vivo*
- Etablir des corrélats entre résultats issus des essais cliniques et pré-cliniques
- Développer des collaborations entre les organismes impliqués (recherche, développement et soutien financier)
- Définir des stratégies d'évaluation des combinaisons de produits
- Etudier la résistance induite par l'utilisation de NRTI et NNRTI

Remerciements

**Groupe Immunité des
Muqueuse et Agents
Pathogènes (EA 3064),
IFRESIS, Université Jean
Monnet, Saint-Etienne**



**Thomas Bourlet
Frédéric Lucht
Olivier Delezay
Hind Hamzeh-Cognasse
Philip Lawrence**



**Unité de Virologie, Institut
de Médecine Tropicale
d'Anvers**

**Guido Vanham
Leo Heyndricks
Youssef Gali**

