

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTOLOGIE



ANNEE : 2016

N° : 205

**EVALUATION DE LA CHARGE VIRALE DU VIH-1 SUR DBS PAR
RAPPORT AUX PRÉLÈVEMENTS PLASMATIQUE SUR TUBE EDTA
AVEC LA PLATEFORME M2000 DES LABORATOIRES ABBOTT**

MEMOIRE

Pour l'obtention du :

Master en Microbiologie Fondamentale et Appliquée

Présentée et soutenue publiquement

Le 05/12/2016

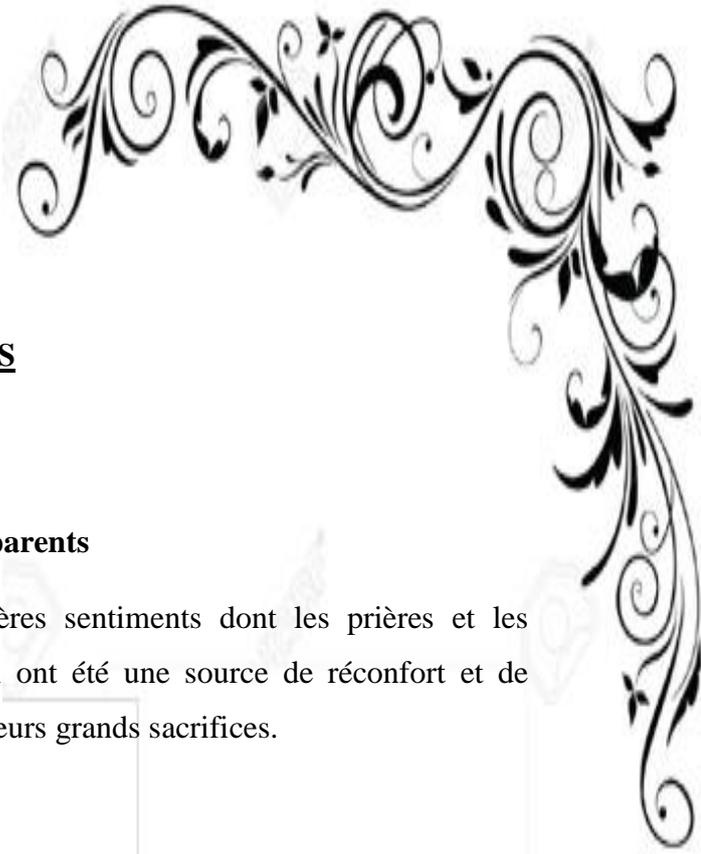
Par : Mlle Samia Kahsay HAGOS

Né le 03 Aout 1991 à Djibouti

MEMBRES DU JURY

Président:	Cheikh Saad Bouh	BOYE	Professeur
Membres :	Mme Halimatou	DIOP	Maitre de conférences agrégé
	Mme Ndèye Coumba Touré	KANE	Professeur
Directrice de mémoire :	Mme Ndèye Coumba Touré	KANE	Professeur

DEDICACE ET REMERCIEMENTS



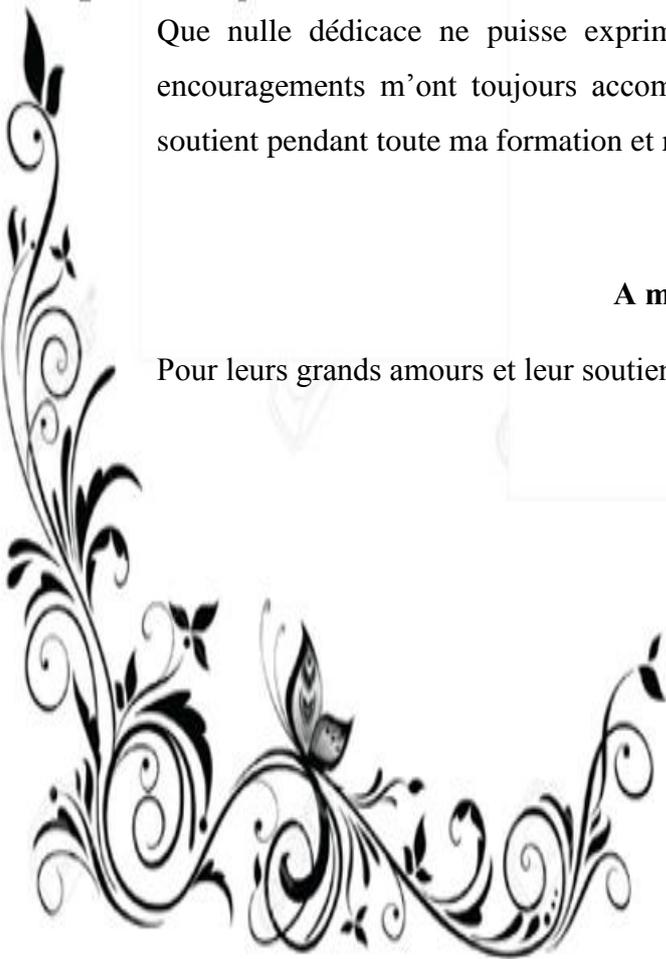
DEDICACES

A mes très chers parents

Que nulle dédicace ne puisse exprimer mes sincères sentiments dont les prières et les encouragements m'ont toujours accompagné et qui ont été une source de réconfort et de soutien pendant toute ma formation et respect pour leurs grands sacrifices.

A mes frères et sœurs,

Pour leurs grands amours et leur soutien qu'ils trouvent ici l'expression de ma haute gratitude.



REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Bactériologie Virologie de l'hôpital Aristide Le dantec à l'unité de la biologie moléculaire. Durant ces mois de stage j'ai bénéficiée des soutiens moraux et matériels de plusieurs personnes et services qui m'ont apporté des soutiens indispensables, ce qui ont largement contribué à la réussite de ce projet, et qui a rendu mes séjours très agréable. J'exprime ma profonde gratitude :

A DIEU le père tout puissant :

Au terme de ce travail, je tiens à remercier **Dieu** le tout puissant de m'avoir donné la santé, le courage, la volonté et la patience pour achever ce travail.

A Notre maître et Directrice de Mémoire,

Le Pr. Ndèye Coumba TOURE KANE, directrice de l'unité du laboratoire de la Bactériologie Virologie, pour m'avoir acceptée avec grand plaisir dans le laboratoire de la Biologie Moléculaire et pour avoir acceptée de diriger ce mémoire. Pour le choix pertinent de ce thème, pour le support économique de cette étude et pour son encadrement très instructif. Nous avons beaucoup apprécié de travailler à ses côtés tant sur le plan scientifique que sur le plan humain.

A Notre maître et Présidente de Jury,

Cher Maître vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider le jury de soutenance "de notre mémoire. Nous avons bénéficié de vos compétences scientifiques tout au long de cette formation universitaire. Votre rigueur dans le travail a été pour nous un exemple. Puisse notre travail être à la hauteur de vos attentes.

Nous vous prions de trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

A Notre maîtres et juges,

Le Pr. Halimatou DIOP, C'est pour nous un grand honneur que vous acceptiez de siéger parmi les membres de notre jury. Vos compétences professionnelles et vos qualités humaines seront pour nous un exemple dans l'exercice de la profession.

A Notre maître et Encadreur,

Dr.Ousseynou NDIAYE, pour avoir accepté d'encadrer ce travail qui malgré ces multiples occupations, a toujours été à l'écoute. Ainsi, je suis très reconnaissante à son égard par le fait qu'il a mis à ma disposition tous les documents nécessaires et renseignements supplémentaires bien précis pour la finalisation de mon mémoire. Pour les relectures et les corrections qu'il a apportées au présent mémoire.

Ses remarques et ses encouragements m'ont permis d'acquérir le dynamisme et l'ambition dans le travail. Ses expériences et de ses connaissances m'ont aidé tout au long de ce travail.

Aux personnels de l'unité de la Biologie Moléculaire,

A Dr. Amina SOW pour sa disponibilité, ses conseils, ses encouragements, et son assistance morale et pour tout son aide.

Je voudrais adresser également mes sincères remerciements à toute l'équipe du Laboratoire de Bactériologie Virologie à qui je dois le fruit de ce travail qui m'ont transmis toutes leurs connaissances dans le domaine de la Biologie Moléculaire.

Plus particulièrement au **Dr. Aboubacry DRAME** qui a accepté de partager son expérience et ses connaissances et pour son aide dans l'exploitation de résultats et Mme **DIABOU** pour son précieux conseil et son assistance apportée lors des manipulations

A tous les étudiants de notre promotion pour la bonne ambiance, les conseils et les encouragements, plus particulièrement **Mengué FALL et Djiba KABA** ;

À tous ceux qui nous ont soutenus dans nos études scolaires et universitaires, de près et de loin.



LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

Ac :	Anticorps
ADN:	Acide désoxyribonucléique
Ag :	Antigène
ARN:	Acide ribonucléique
ARV :	Anti RétroViral
CCR5 :	CC chemokine Receptor type 5 (Récepteur de chimiokines 5)
CD4 :	Classe de Différenciation 4 exprimée lymphocytes CD4+
CD8 :	Classe de Différenciation 8 exprimée lymphocytes CD8+
CHU FANN :	Centre hospitalière universitaire de FANN
CRCF :	Centre Régionale de Recherche et de Formation à la Prise en charge Clinique
CRF :	Circulating Recombinant Form (formes recombinantes circulantes)
CVP:	Charge virale plasmatique
CXCR4 :	CXC chemokine receptor type 4 (récepteur de chimiokines 4)
DBS :	Dried Blood Spots
EDTA :	Ethylène Diamine Tétra-Acétique
ELISA:	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ENV :	Gène de l'enveloppe
env:	Proteine
gag :	Gène des Antigènes de Groupe
Gag:	Group Specific Antigens
gp 41 :	Glycoprotéine 41
gp :	Glycoprotéine
gp120 :	Glycoprotéine 120

HALD :	Hôpital Aristid Le Dantec
IgG :	Immunoglobulines de type G
IgM :	Immunoglobulines de type M
ISAARV :	Initiative Sénégalaise d'Accès aux Antirétroviraux
IST :	Infections Sexuellement Transmissibles
LBV :	Laboratoire Bactériologie Virologie
LBV-HALD :	Laboratoire de Bactériologie et de Virologie de HALD
LTR:	Long terminal repeat
LT :	Lymphocyte T
OMS :	Organisation mondiale de la santé
ONU SIDA :	Organisation des nations unies pour le SIDA
P17 :	Protéine 17
p24 :	Protéine 24
P7 :	Protéine 7
rev :	Gène Regulator of Expression Virus
RT/PCR :	Reverse Transcriptase/Polymerase Chain Reaction
SIDA :	Syndrome de l'Immuno-Déficienc e Acquis e
tat :	Gène de Trans-Activator of Transcription
TDR :	Test Diagnostic Rapide
TI :	Transcriptase Inverse
vif :	Gène Virion Infectivity Factor
VIH :	<i>Virus de l'Immuno-Déficienc e Humaine</i>
VIH-1 :	<i>Virus de l'Immunodéficienc e Humaine de type 1</i>
VIH-2 :	<i>Virus de l'Immunodéficienc e Humaine de type 2</i>
VIS :	<i>Virus de l'Immunodéficienc e Simienne</i>

VIScp :	<i>Virus de l'Immunodéficience Simien des chimpanzés</i>
VISgor :	<i>Virus de l'Immunodéficience Simien des gorilles</i>
vpr :	Gène Viral protein R
vpu :	Gène Viral Protein U
vpX :	Gène Viral Protein X
WB :	Western Blot

LISTE DES FIGURES ET **TABLEAUX**

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Particule virale du VIH-1 mature	5
Figure 2 : Structure du génome viral.....	7
Figure 3 : Attachement ou fixation du génome viral	8
Figure 4 : Génome viral et proviral.....	9
Figure 5 : Intégration de l'ADN virale dans le noyau cellulaire	10
Figure 6 : Schéma de la traduction de l'ARNm.....	11
Figure 7 : Cycle de réplication du VIH.....	12
Figure 8 : Diversité génétique du VIH-1.....	15
Figure 9 : Distribution mondiale et diversité génétique des neuf sous-types principaux et des recombinants du VIH-1	16
Figure 10 : Évolution physiologique de l'infection à VIH	19
Figure 11 : Photo des différents étapes de la confection des DBS.....	33
Figure 12: : FACS Count	34
Figure 13 : Appareil Abbott m2000sp Figure 14B : Real Time PCR m2000rt (Abbott).....	35
Figure 14 : Répartition des patients en fonction de la CV plasmatiques	41
Figure 15 : Répartition des patients en fonction de la CV sur DBS.....	42
Figure 16 : Comparaison des valeurs de CV des deux techniques DBS contre plasma	43
Figure 17 : Corrélation des charges virale ARN VIH+ plasmatique et DBS.....	45
Figure 18 : Bland-Altman, différence entre les concentrations d'ARN VIH+ plasma et DBS	45

TABLEAUX

Tableau 1 : Schémas de TARV de première intention privilégiés et autres options conseillées	26
Tableau 2 : Changement de schéma ARV en cas d'échec thérapeutique	27
Tableau 3 : Tableau récapitulatif des valeurs de CD4.....	40
Tableau 4 : Similarité des deux méthodes en termes de détectabilité et de non détectabilité des valeurs de CV	44

SOMMAIRE

DEDICACES	II
REMERCIEMENTS	III
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	VI
LISTE DES FIGURES	X
TABLEAUX	XI
SOMMAIRE	XII
INTRODUCTION	1
PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	3
CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉS	4
I. STRUCTURE DES VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE	4
II. CYCLE DE RÉPLICATION DU VIH	8
III. DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DU VIH	13
IV. EPIDEMIOLOGIE	17
V. MODES DE TRANSMISSION DU VIH	18
VI. ETHIOPATHOLOGIE.....	18
CHAPITRE II. LE DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE ET MONITORING BIOLOGIQUE DU VIH	21
I. LES DIFFERENTS TECHNIQUES DE QUANTIFICATION DU VIH-1	21
II. TRAITEMENT	24
II.1. Le choix thérapeutique (OMS, 2015)	26
CHAPITRE III : UTILITE DU PAPIER BUVARD DANS LE MONITORING VIROLOGIQUE	28
I. Propriétés du papier buvard.....	28
II. Les avantages du papier buvard	29
PARTIE II : TRAVAIL EXPERIMENTAL	30
CHAPITRE I : METHODOLOGIE	31
1. CONTEXTE.....	31
CHAPITRE II : MATERIELS/METHODES	32
1. MATÉRIELS/RÉACTIFS.....	32
2. METHODES	36
CHAPITRE III : RESULTATS/DISCUSSION	40
1. RÉSULTATS	40

2. DISCUSSION	47
CONCLUSION	49
LES RECOMMANDATIONS	50
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	51
REFERENCES WEBOGRAPHIQUE	59
TABLE DES MATIERES	61
RÉSUMÉ	64

INTRODUCTION

Le Virus de l'Immunodéficience humaine (VIH) est un rétrovirus infectant l'homme et le conduisant à plus ou moins long terme au Syndrome d'Immunodéficience Acquise (SIDA). Les premiers cas ont été décrits pour la première fois au cours des années 80 aux USA par le Centre of Diseases Control (CDC) après une recrudescence des cas de pneumonies et de sarcomes de Kaposi. Le VIH est un virus à ARN (acide ribonucléique) appartenant à la famille des *Retroviridae* qui est caractérisée par une étape de rétro transcription du génome en ADN (acide désoxyribonucléique) qui va s'intégrer au génome de l'hôte. Le génome viral est caractérisé par deux brins ARN associé à une enzyme de transcription inverse (la retro-transcriptase). Le génome comprend 3 principaux gènes codant pour les protéines de structures et les enzymes virales et 6 gènes accessoires intervenant dans la régulation du cycle de réplication. La pandémie est ainsi caractérisée par la circulation de plusieurs sous-types génétiques et des recombinants inter-sous-types. Cette grande diversité génétique ne cesse d'augmenter avec des doubles infections entre les sous types du VIH mais également des cas de co-infections entre le VIH et les autres infections.

L'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) a une épidémiologie continentale variable en fonction des pays et des zones géographiques. Le continent africain est le plus touché par cette infection. En 2015, 36,7 millions de personnes [34 millions–39,8 millions] vivaient avec le VIH (ONUSIDA 2015). En décembre 2015, 17 millions de personnes vivant avec le VIH (PVVIH) avaient accès à la thérapie antirétrovirale, contre 15,8 millions en juin 2015 et 7,5 millions en 2010 (ONUSIDA 2015). Plus de 75 % de ces personnes vivent dans des pays à ressources limitées.

Ainsi pour une meilleure évaluation de l'efficacité du traitement et le moment opportun pour un changement thérapeutique, la charge virale est indispensable et est devenue une recommandation forte de l'OMS. La charge virale constitue donc un marqueur prédictif important pour le suivi biologique de l'infection à VIH (ONUSIDA, 2012, UNAIDS, 2010).

Toutefois, les laboratoires spécialisés sont pour la plupart en nombre limité au niveau décentralisé et sous équipés pour supporter les contraintes liées au diagnostic et du suivi de l'infection à VIH. Les difficultés logistiques telles que le transport des échantillons sanguins

et le respect de la chaîne de froid rendent difficile le monitoring des patients qui vivent en milieu décentralisé.

Ainsi pour rendre la charge virale disponible au niveau décentralisé, les DBS (Dried Blood Spot) constituent une bonne alternative au plasma par rapport aux contraintes liées à la conservation et à l'acheminement.

C'est pour répondre à cette préoccupation que ce travail a été entrepris et avec comme objectif de comparer la charge virale VIH-1 sur DBS par rapport aux prélèvements sur tube EDTA en utilisant la plateforme m2000 des laboratoires Abbott.

Pour mener à bien ce travail, le présent document s'articulera sur 2 grandes:

- ❖ Une première partie de généralités sur le virus ;
- ❖ Une deuxième partie qui portera sur la description du matériel, de la méthodologie utilisée, la présentation des résultats obtenus et qui seront discutées avec des données de la littérature

PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉS

I. STRUCTURE DES VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE

I.1. Morphologie

Le VIH-1 a été isolé et décrit en 1983 par l'équipe française de Luc Montagnier (**Barre-Sinoussi *et al.*, 1983**). Même si sa morphologie et son organisation moléculaire sont assez bien connues, les fonctions de ses différents gènes et leurs interactions avec les composants de la cellule hôte ne sont pas encore totalement étudiées.

Au microscope électronique, le virion mature se présente sous forme d'une particule sphérique enveloppée de 80-120 nm de diamètre (Figure 1). Comme tous les *lentivirus*, le VIH est constitué de :

✓ L'enveloppe virale :

Elle est constituée d'une bicouche phospholipidique et de deux glycoprotéines : la gp120^{SU} et gp 41TM. La molécule gp 41 traverse la bicouche lipidique tandis que la molécule gp120 occupe une position plus périphérique. L'enveloppe virale dérive de la cellule hôte et contient ainsi des protéines membranaires de cette dernière parmi lesquelles les antigènes du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité), l'actine et l'ubiquitine (**Arthur, 1992**). Pour le VIH-2, les équivalents respectifs des glycoprotéines gp120 et gp 41 sont la gp125 et de la gp36.

✓ Matrice virale p17^{MA}

Constituée par la protéine p17, la matrice participe à la stabilité de la structure virale, grâce à sa liaison avec la bicouche phospholipidique qui sert d'enveloppe virale. La protéine de la matrice p17MA est impliquée dans les 2 phases (précoce et tardive) de la réplication virale et dans la production de particules infectieuses. (**Davis, 2006; Murakami, 2012**).

✓ La Capside p24^{CA}

C'est la protéine majeure du core du virus. Il s'agit d'une protéine phosphorylée de 24kD qui se présente sous forme d'oligomérique. Elle se condense autour du génome viral pour générer la nucléocapside de forme conique qui comprend 2 domaines indépendants. (**Gamble *et al.*, 1997**)

✓ **La protéine p7 NC**

La p7 NC est une petite protéine fortement basique de moins de 100 acides aminés. Elle se lie à l'ARN génomique dont elle assure l'encapsidation dans le virion en assemblage (**D'Souza and Summers, 2005**).

✓ **La protéine p6**

La protéine p6 est importante pour l'incorporation de la protéine accessoire Vpr à laquelle elle est associée (**Kondo et al., 1995**).

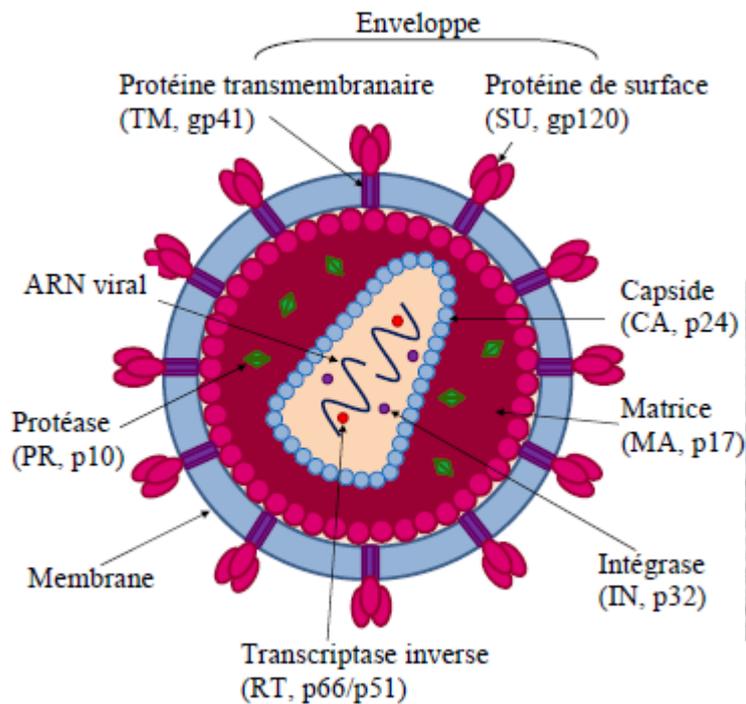


Figure 1 : Particule virale du VIH-1 mature

(Ganser-Pornillos et al, 2008)

I.2. Organisation génomique du VIH

Le génome du VIH-1 est d'une longueur de 9.2 kb et contenant des gènes qui sont au nombre de neuf. Ces gènes sont classés suivant trois groupes fonctionnels en gènes de structure (*gag*, *pol* et *env*), gènes accessoires composés par les gènes régulateurs (*tat* et *rev*) et les gènes auxiliaires (*vpu*, *vpr*, *vif* et *nef*). Neuf cadres de lecture ouverts (Open Reading Frames, ORFs) sont présents, chacun correspondant à un gène. L'ARN viral est flanqué à ses extrémités des séquences non codantes contenant de nombreux sites potentiels de liaisons à des protéines cellulaires : ce sont les LTR (Long Terminal Repeat).

❖ Les LTR (Long Terminal Repeat)

Les LTR (Long Terminal Repeat) constituent deux domaines du génome viral non codants. Elles sont composées de trois régions : U5, R, U3. Ces régions sont impliquées dans l'initiation de la rétrotranscription et l'intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte (**Perkins *et al.*, 1993**).

❖ Les gènes de structure

✓ Le gène gag (gène des antigènes de groupe)

Le gène *gag* est le premier cadre de lecture ouvert sur le génome du VIH. D'environ 1500 pb, ce gène code pour la polyprotéine Pr55^{Gag} N-myristylée qui comprend quatre domaines majeurs : la matrice (MA), la capsid (CA), la Nucléocapside (NC) et la p6 (figure 2). La protéine Gag est nécessaire à l'assemblage et au bourgeonnement de particules virales à la surface des cellules infectées (**Shehu-Xhilaga *et al.*, 2001**).

✓ Le Gène ENV (gène codant pour les protéines de l'enveloppe)

Il code pour les glycoprotéines d'enveloppe, gp120SU et gp41TM équivalents respectivement pour le VIH-2 aux gp125 et gp36. Ils sont responsables de la fixation du virus sur le récepteur cellulaire et son entrée dans la cellule hôte. Leur emplacement sur la surface du virus fait d'eux des cibles idéales pour les anticorps neutralisants (**Center *et al.*, 2002**). Le gène *env* est le gène viral le plus variable.

✓ Le gène *pol* (gène codant pour les enzymes virales)

C'est le gène le plus conservé du génome viral avec une divergence intra sous-type d'environ 9 à 11% (**Santos and Soares, 2010**). Il code pour les 3 enzymes virales, protéase (PR), transcriptase inverse (TI) et intégrase (IN) qui sont obtenues après clivage du précurseur Pr160^{Gag-Pol}. La Pr160^{Gag-Pol} est une polyprotéine engendrée parallèlement au précurseur Pr55^{gag} mais en moindre quantité.

✚ La protéase virale (PR)

C'est l'enzyme essentielle à la maturation et la production de particules virales infectieuses. Indispensable au processus post-traductionnel, elle assure le clivage des polyprotéines Pr55^{Gag} et P160^{Gag-Pol}.

✚ La transcriptase inverse TI ou Reverse Transcriptase (RT)

factor), **Tat** (Transactivator of transcription), **Rev** (Regulator of viral expression), **Vif** (Viral infectivity factor) et **Vpr** (Viral protein R) (HASELTINE, 1991 ; WANG et coll., 2000).

II. CYCLE DE RÉPLICATION DU VIH

Entre le moment où il se fixe sur la surface de la cellule cible et l'intégration de son génome dans le noyau cellulaire, pour se répliquer et assurer sa survie, le VIH va devoir déjouer beaucoup d'obstacles et détourner le fonctionnement de sa cellule hôte (**Nisole and Saib, 2004**). Le cycle de réplication est composé de plusieurs étapes pouvant être divisées en 2 phases : Une phase précoce qui commence par l'attachement du virus sur son récepteur spécifique et finit par l'intégration de l'ADNc dans le génome cellulaire. Et une phase tardive qui débute par l'expression des gènes viraux et aboutit à la libération des virions par bourgeonnement à la surface de la membrane cellulaire. La cible principale du VIH est la cellule T CD4+ (**Barre-Sinoussi, 1983**).

II.1. Une phase précoce du cycle viral

✚ La fixation par gp120

La gp120 du virus se fixe au récepteur cellulaire qui est la molécule CD4. La molécule CD4 caractérise les lymphocytes auxiliaires (les lymphocytes Th ou CD4+). Elle est également présente sur les macrophages, les cellules dendritiques des ganglions, de la rate et de l'épiderme (les cellules de Langerhans) ainsi que sur les cellules microgliales du cerveau (qui sont les macrophages résidents du système nerveux central) (**REVILLARD et al, 2001**).

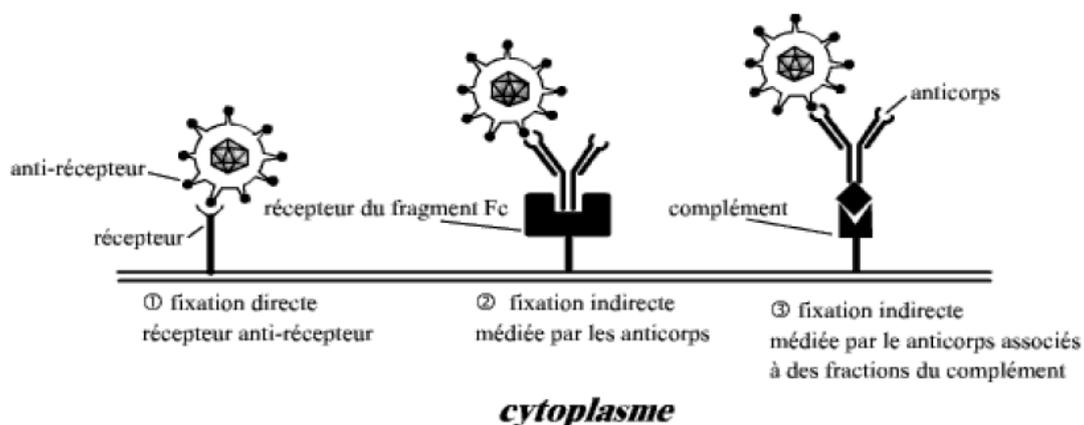


Figure 3 : Attachement ou fixation du génome viral

Source : (<http://cdfsvt.free.fr/dossiers/svt0207b.pdf>) consulté le 23 Novembre 2016

✚ La pénétration par fusion et la décapsidation

Après s'être fixée à la molécule CD4, la gp120 du virus doit trouver un second récepteur cellulaire, qui est un co-récepteur ; il se forme un complexe trimérique CD4-gp120-corécepteur indispensable pour permettre à la glycoprotéine gp 41 d'exercer son activité fusionnante.

Ces co-récepteurs du VIH sont des récepteurs cellulaires à diverses chimiokines (cytokines) attirantes et recrutant les leucocytes au cours des réactions immunitaires : Ce sont les CCR5 sur les macrophages et les CXCR4 sur les lymphocytes Th (T). La région de gp120 qui se fixe au co-récepteur s'appelle **la boucle variable V3** (REVILLARD, 2001).

Une infection par le VIH s'établit avec une souche à tropisme macrophage, puis des variantes vont apparaître au cours de l'infection, dotés d'un double tropisme macrophage et lymphocyte T CD4+. Mais à la phase terminale, la majorité des virus ont un tropisme pour les lymphocytes T CD4+.

Dans le cytoplasme, la capsid se désagrège afin de libérer le génome du virus dans le milieu intracellulaire. Ainsi, la protéine gp120 est responsable de l'attachement et gp41 de la fusion, puis de la pénétration au sein de la cellule.

✚ La réplication

Dans le cytoplasme de la cellule hôte, la transcriptase inverse virale copie l'ARN en ADN simple brin, grâce à son activité ARNase H, elle dégrade le brin d'ARN hybride ADN-ARN et copie l'ADN simple brin pour former un ADN bicaténaire.

La réplication suit un mécanisme très complexe qui conduit à la création de séquences particulières aux extrémités de l'ADN proviral : les LTR (Long Terminal Repeat).

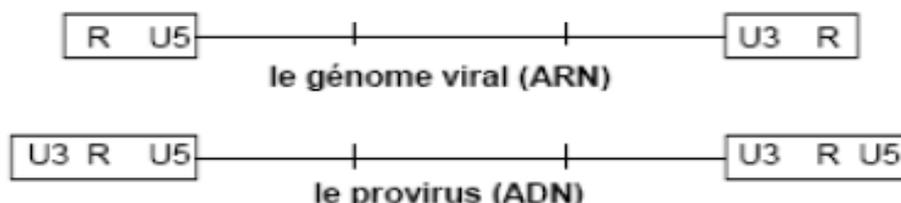


Figure 4 : Génome viral et proviral.

(HURAUX, 2007).

Bien que ces séquences soient identiques, elles ne vont pas jouer le même rôle. En effet, à l'extrémité 5' le LTR est un promoteur puissant de la transcription et en 3' le LTR fournit le signal de coupure qui précède la polyadénylation (ARNm). C'est aussi un promoteur potentiellement capable d'activer un gène cellulaire situé à proximité.

✚ La circularisation

L'ADN viral est transporté dans le noyau, avec l'intégrase virale. L'intégrase se fixe au niveau des LTR (KABORE R. Ibrahim, 2010).

✚ L'intégration

L'intégrase coupe les deux brins de l'ADN cellulaire pour introduire l'ADN viral. L'intégration semble pouvoir se faire dans de multiples sites de l'ADN cellulaire. L'intégration dépend aussi de l'activation des cellules infectées.

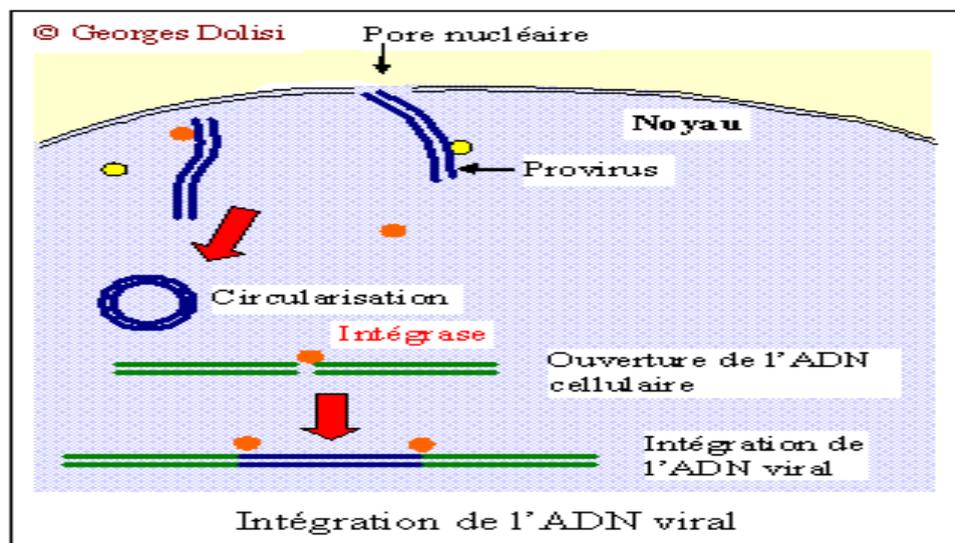


Figure 5 : Intégration de l'ADN virale dans le noyau cellulaire

Source : (http://georges.dolisi.free.fr/Physiopathologie/sida_infection.htm) consulté 3 juin 2016

II.2. Une phase tardive cycle viral

✚ La traduction

Après avoir été transcrits par l'ARN polymérase de la cellule, les ARN messagers viraux sont traduits en trois précurseurs protéiques. Ces précurseurs sont clivés par des protéases, pour donner les différentes protéines virales (KABORE R. Ibrahim, 2010).

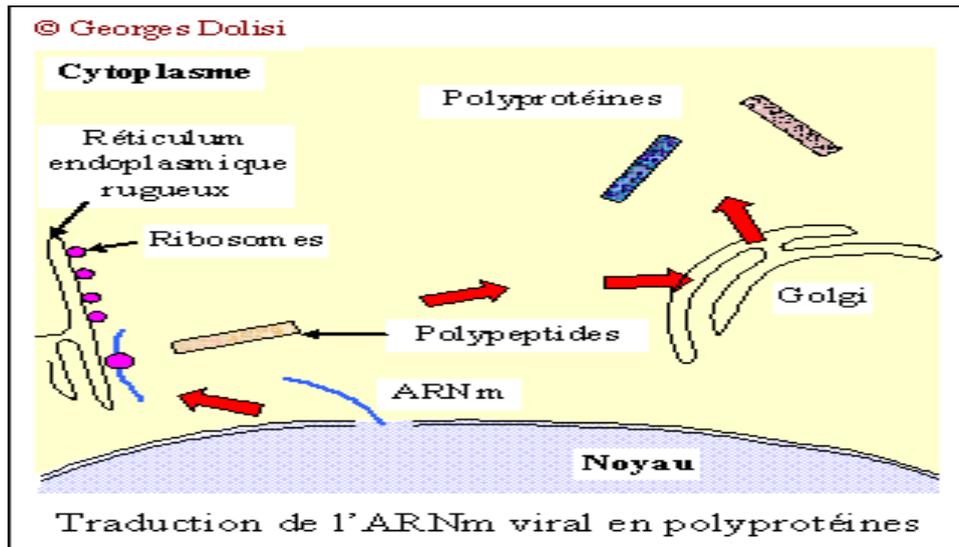


Figure 6 : Schéma de la traduction de l'ARNm

Source : (http://georges.dolisi.free.fr/Physiopathologie/sida_infection.htm) consulté 3 juin 2016

✚ L'assemblage

Les protéines virales et l'ARN viral sont associés pour former de nouvelles particules virales infectieuses. Les protéines virales membranaires sont intégrées à la membrane du lymphocyte (**Woodward CL, 21015**).

✚ Le bourgeonnement

Le virus bourgeonne, emportant un fragment de la membrane plasmique du lymphocyte sur laquelle sont intégrées les protéines membranaires virales (**Woodward CL, 21015**).

✚ La libération

Les nouveaux virus sont libérés dans le milieu intérieur. Ils peuvent infecter de nouveaux lymphocytes T CD4 (**Woodward CL, 21015**).

Le cycle du VIH

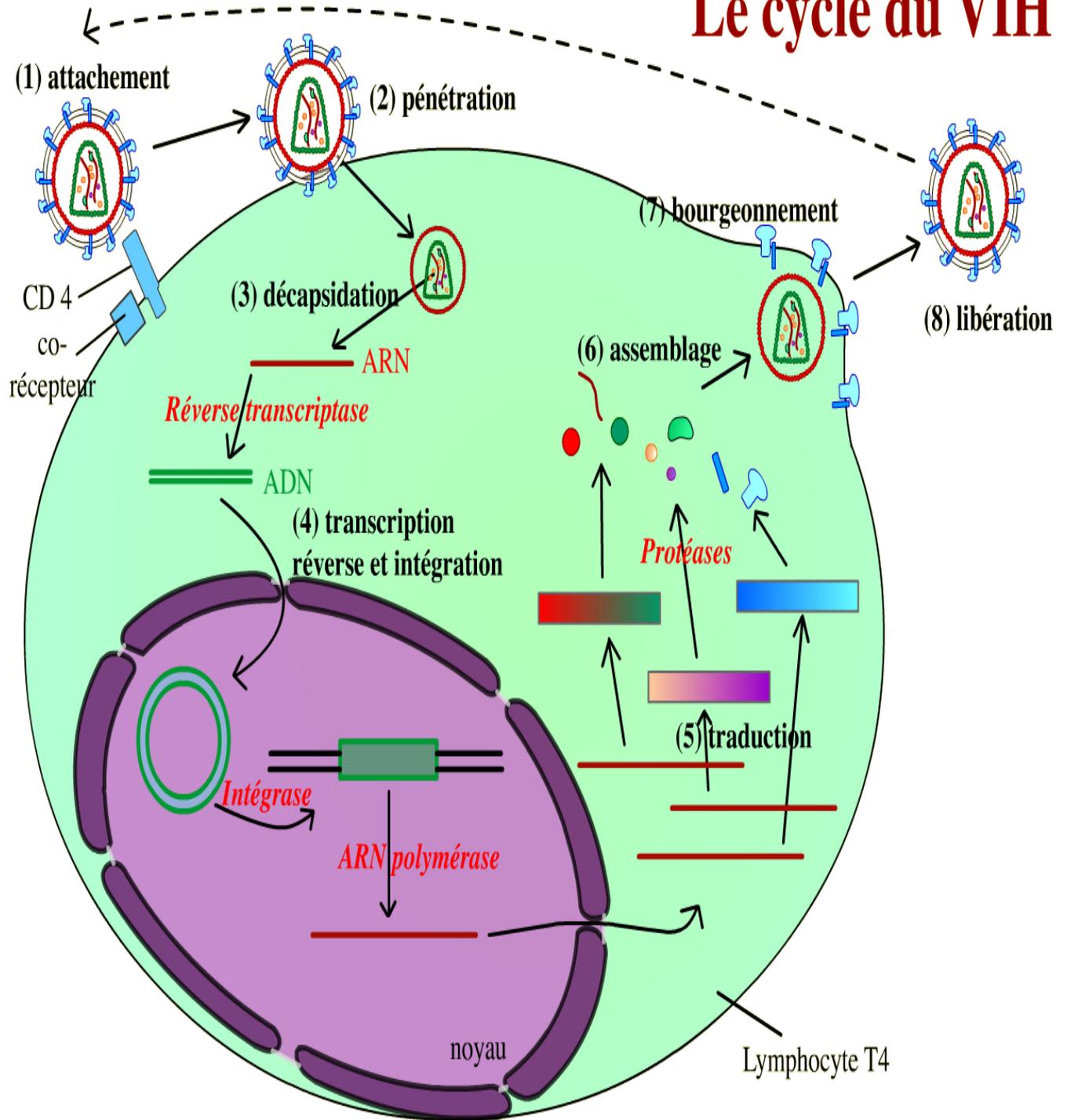


Figure 7 : Cycle de réplication du VIH.

(Source : <https://sites.google.com/site/tpmathematiquesetvih/home/presentation-du-vih/presentation/generalites-vih>) consulté 3 juin 2016

III. DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DU VIH

L'apparition d'une nouvelle variante génétique est due à un processus évolutif dont les mécanismes sont semblables à ceux qui expliquent l'évolution de toute espèce vivante. Une des caractéristiques majeures des VIH est sa grande variabilité et elle est responsable de la classification du virus en types, groupes, sous-types, sous sous-types et formes recombinantes unique et circulantes. Cette grande variabilité génétique du VIH s'explique par un taux de réplication très élevé combiné à la survenue de mutations aléatoires fréquentes, la sélection naturelle et les recombinaisons génétiques (**Rambaut *et al.*, 2004; Robertson *et al.*, 1995**).

III.1. Origine de la variabilité génétique

Trois principaux facteurs peuvent être à l'origine de la diversité génétique : les mutations aléatoires, la pression de sélection et la recombinaison génétique.

✓ Les mutations aléatoires fréquentes

Le VIH présente un taux de mutations très important, plus de mille fois plus importante que dans le génome d'un humain. Ce phénomène est dû au fait que la transcriptase inverse ne présente pas d'activité 3'-5' exonucléasique. Elle n'a donc pas de système de correction d'erreurs survenant au cours de la synthèse de l'ADNc (**Bakhanashvili *et al.*, 2005**).

✓ Les pressions de sélection

Elles sont de 2 types : négative et positive. La pression négative est favorisée par les erreurs de transcription et les recombinaisons produisent de nombreux virions différents les uns des autres. La plupart de ces mutations sont synonymes ou silencieuses, n'entraînant pas de changement d'acide aminé ou de propriétés chimiques de l'acide aminé et produisent des virions incapables de se répliquer correctement, ce qui les destine à disparaître. Et la pression de sélection positive est favorisée par substitutions d'acide aminé (mutations non-synonymes). (**Kuiken *et al.*, 1993**).

✓ Les recombinaisons génétiques

Lorsqu'une cellule est infectée par deux virions génétiquement différents, les séquences peuvent se recombiner, ce qui donne naissance à des formes recombinantes. Ce processus,

aléatoire, est favorisé par les comportements à risque parce qu'ils augmentent la probabilité de contaminations multiples chez une même personne (**Jetzt et al., 2000**).

III.2. Les différents groupes, sous types et formes recombinants

L'origine du VIH humain est retracée comme liée à de multiples infections zoonotiques et probablement liés aux contacts des chasseurs et bouchers avec les fluides corporelles des primates infectés par les SIV (**Kalish et al., 2005; Wolfe et al., 2004**). Deux types de VIH sont distingués, le VIH-1 provenant du SIV des chimpanzés (SIV cpz) (**Gao et al., 1999**) et le VIH-2 provenant du SIV de sooty mangabeys (SIV sm) (**Gao et al., 1992**). La multiplicité des passages des SIV à l'homme est à l'origine de l'existence des différents groupes du VIH. Le VIH-1 est à l'origine de la grande pandémie du SIDA et peut être subdivisé en quatre groupes (M, N, O et P).

✓ Les différents groupes du VIH-1

Le VIH-1 groupe O (Outlier) est le groupe le plus divergent et des études ont suggéré qu'il aurait pour origine des SIV infectant les gorilles (SIV gor) (**Van Heuverswyn et al., 2006**).

Le VIH-1 groupe N (New) a été identifié en 1998 (**Simon et al., 1998**) et aurait pour origine une lignée de SIV cpz retrouvée chez les chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes* de la partie centrale et du Sud Cameroun (**Keele et al., 2006**).

Récemment, un nouveau groupe (P) a été décrit chez une femme d'origine camerounaise (**Plantier et al., 2009**). Ce groupe serait proche du SIV gor sans évidence de recombinaison avec les autres groupes du VIH-1

Le VIH-1 groupe M (Major) est responsable de la pandémie actuelle du SIDA avec plus de 95% des personnes vivant avec le VIH. Son origine a été clairement établie et il proviendrait d'un SIV cpzPtt qui est encore retrouvé chez les chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes* du Sud-Est du Cameroun (**Keele et al., 2006**).

✓ Les différents sous-types et formes recombinantes du groupe M

Selon la classification actuelle, le groupe M du VIH-1 comprend neuf différents sous-types « purs » ou formes non recombinantes (A-D, F-H, J et K). La divergence des nucléotides entre les sous-types du VIH-1 est de 25 à 30% au niveau du gène *env* alors que dans le gène *pol* (la partie la plus conservée du génome des rétrovirus), elle est d'environ 9-11% (**Santos and Soares, 2010**).

L'apparition de discordance dans l'analyse phylogénétique entre le gène *env* et *gag* suggèrent la présence de formes recombinantes. Les premiers cas de recombinaison identifiés concernés le sous-type E qui formait un cluster unique particulier dans l'analyse du gène *env* alors que sur l'analyse du gène *gag* il se regroupait dans le cluster du sous-type A. Ainsi le sous-type E « pur » était le résultat d'un événement de recombinaison entre le sous-type A d'une région *gag* et de la région *env* d'une autre souche (McCutchan *et al.*, 1996). Cette virus recombinant a été donc renommé CRF01_AE du nom des sous-types qui le composent. D'autres cas de formes recombinantes ont été décrites comme le sous-type G qui est classé A en *env* et G en *gag* (Carr *et al.*, 1998/McCutchan *et al.*, 1999/Santos *et al.*, 2006). Le sous-type I « pur » a été identifié comme étant un recombinant complexe impliquant entre les sous-types A, G et I (Nasioulas *et al.*, 1999)

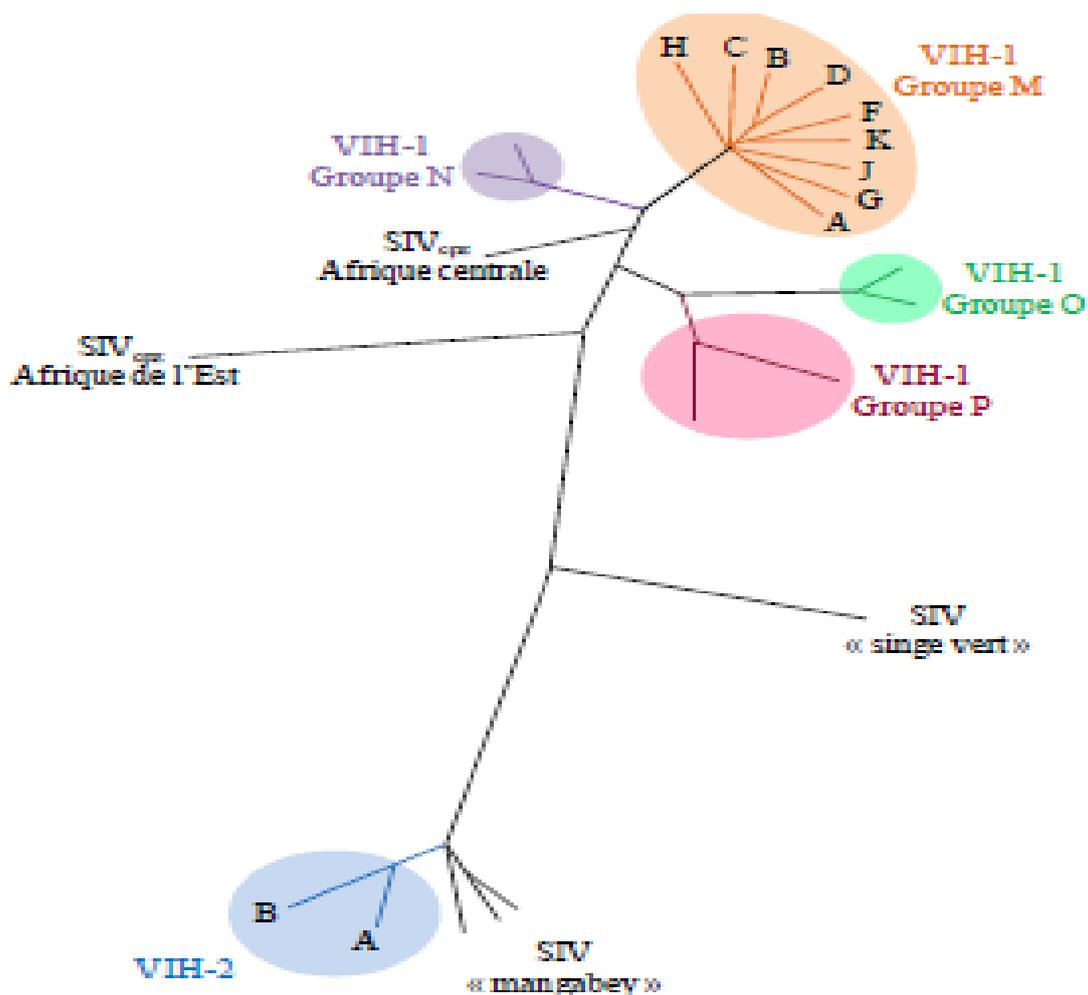


Figure 8 : Diversité génétique du VIH-1.

(Alizé PROUST, 2013).

Les souches du groupe M représentent presque toutes les souches circulantes. Les virus du groupe O ne représentent qu'une minorité de souches circulantes. Ils sont trouvés en Afrique centrale et plus spécialement au Cameroun où ils représentent 2 % des VIH-1. Le groupe N a été identifié chez une quinzaine de patients camerounais. Le groupe M est actuellement subdivisé en neuf sous-types: A, B, C, D, E, F, G, H, J, dits «purs» et de nombreuses formes recombinantes dites mosaïques de différents sous-types. Certains virus mosaïques jouent un rôle majeur dans l'épidémie mondiale de SIDA, d'où leur appellation de «*Circulating Recombinants Forms*» ou CRFs ; c'est l'exemple de la forme recombinante entre les sous-types A et G, dite CRF02 ; responsables d'un grand nombre d'infections en Afrique de l'Ouest (ROQUEBET, 2009).



Figure 9 : Distribution mondiale et diversité génétique des neuf sous-types principaux et des recombinants du VIH-1

(Taylor, 2008)

Les différents sous-types prédominants du VIH-1 se répartissent ainsi suivant les régions : Afrique de l'ouest (A), Afrique de l'est et du sud (C), Afrique centrale (A, C, D, CRF_01AE, F, CRF_02AG, H, J), Inde (C), Asie du sud-est (B, CRF_01AE), Amérique latine : B, F. Des situations d'échec des anticorps anti-VIH liées à des mutations de certains isolats ont été rares, mais régulièrement rapportées. Les tests moléculaires de détection et de quantification de l'ARN viral plasmatique sont également affectés par la diversité génétique du VIH-1.

IV. EPIDEMIOLOGIE

Pour suivre l'évolution de l'épidémie du VIH et évaluer l'efficacité des stratégies de prévention, le Programme commun des Nations Unies sur le VIH/SIDA (ONUSIDA) estime le nombre de personnes vivant avec le VIH (prévalence) et le nombre de nouvelles infections par le VIH se produisant chaque année (incidence) (UNAIDS, 2015).

Le VIH continue d'être un problème majeur de santé publique.

En 2015, 1,1 [940 000-1,3] million de personnes sont décédées d'une cause liée au VIH dans le monde.

Fin 2015, comptait environ 36,7 [34-39,8] millions de personnes vivant avec le VIH, dont 2,1 [1,8-2,4] millions de nouvelles infections dans le monde.

L'Afrique subsaharienne, où 25,6 [23-28,8] millions de personnes vivaient avec le VIH en 2015, est la région la plus touchée. Elle concentre également près des deux-tiers des nouvelles infections dans le monde (Aide-mémoire N°360 Juillet 2016)

(<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/fr/>) consulté le 23 novembre 2016.

Chez les adultes, la baisse des nouvelles infections est hélas nettement moins conséquente : 1,8 million en 2014 contre 2 millions en 2008. « Un nombre in-acceptablement élevé de nouvelles infections à VIH et de décès liés au sida surviennent encore chaque année », rappelle l'organisation onusienne. 2 millions de personnes au total ont en effet été infectées par le VIH en 2014 tandis que 1,2 million est décédé du sida. Chaque jour, 5600 personnes sont donc nouvellement infectées. Parmi elles, un tiers a entre 15 et 24 ans, et 12% sont des enfants.

(ONUSIDA,2015)http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/20150901_FactSheet_2015_fr.pdf: (consulté le 07 décembre 2016)

V. MODES DE TRANSMISSION DU VIH

Depuis le début de l'épidémie, trois principaux modes de transmission ont été observés : la transmission par voie sexuelle, la transmission par voie sanguine et la transmission mère-enfant.

V.1. La transmission par voie sexuelle

A l'échelle mondiale, la grande majorité des infections par le VIH ont été acquises à l'occasion de rapports sexuels non protégés, qu'ils soient hétérosexuels ou homosexuels. La transmission sexuelle de l'infection à VIH se fait par l'intermédiaire des muqueuses buccale, génitale ou rectale, lorsqu'elles sont en contact avec des sécrétions sexuelles ou du sang contenant du virus. La muqueuse présente une certaine perméabilité vis-à-vis du VIH et on peut retrouver des cellules infectées (cellules dendritiques) dans la sous muqueuse après une exposition non traumatique de l'épithélium vaginale au VIH. La muqueuse rectale, par son épithélium monocellulaire, c'est la plus susceptible à l'infection (Pierre-Marie *et al*, 2004).

V.2. Transmission par voie sanguine

La transmission par voie sanguine concerne principalement trois groupes de population: les usagers de drogues par voie intraveineuse, les hémophiles et les transfusés, et plus rarement les professionnels de santé en milieu de soins et laboratoires, victimes d'accident d'exposition au sang (Pierre-Marie *et al*, 2004).

V.3. Transmission verticale

Il s'agit d'une transmission du virus de la mère à l'enfant. Ce mode de transmission peut survenir à différentes étapes de la grossesse. Dans un tiers des cas, il survient in utero, dans les semaines précédant l'accouchement et dans deux tiers des cas il survient en intra-partum, au moment de l'accouchement UNAIDS 2013 ([http:// www. unaids. org/ sites/ default/ files/ media_ asset/ prevention_ fr_ 0.pdf](http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/prevention_fr_0.pdf)) consulté le 23 novembre 2016.

L'infection va par la suite évoluer en trois grandes phases qui vont être décrits dans le chapitre physiopathologie.

VI. ETHIOPATHOLOGIE

❖ Évolution physiologique de l'infection à VIH-1

D'un point de vue clinique, immunologique et virologique, L'infection à VIH se manifeste principalement en trois phases : la phase de primo-infection, la phase asymptomatique et la phase chronique

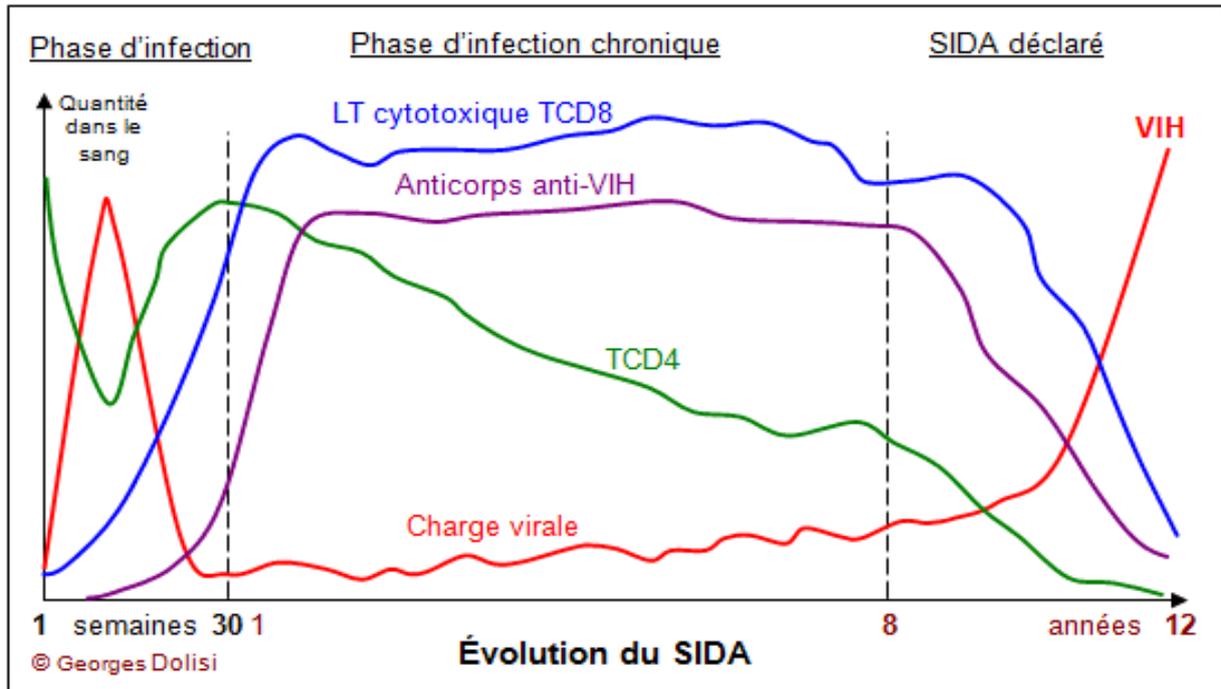


Figure 10 : Évolution physiologique de l'infection à VIH

(<http://www.cegid.fr/VIH-SIDA.htm>) consulté 17 janvier 2016

VI.1. La phase de primo-infection

Elle est symptomatique ou asymptomatique, c'est à dire cliniquement silencieuse. Elle a lieu entre 1 à 3 semaines après le contact avec le virus. Mais, comme ces symptômes ressemblent à ceux qu'on observe au cours de diverses affections virales aiguës (mononucléose infectieuse), la primo-infection risque souvent de passer inaperçue. Les premiers signes de primo-infection apparaissent en moyenne 20 jours après la contamination et dure de 1 à 7 semaines. Cette phase correspond à une multiplication virale intense et à la dissémination du virus et est caractérisée par une forte virémie. Cette période est dite dangereuse car on estime que 52 à 90% des personnes contaminées l'ont été par une personne en phase de primo-infection.

L'évolution vers le Sida est plus rapide après une primo-infection symptomatique (on constate en effet une charge virale très élevée). Le système immunitaire réagit à l'infection et, en quelques semaines, des anticorps apparaissent dans le sérum, dirigés contre l'ensemble des protéines du VIH : **c'est la séroconversion**. Le sujet infecté devient séropositif.

VI.2. Phase de latence ou d'infection chronique

La deuxième phase est asymptomatique (phase de séropositivité) et peut être très prolongée (10 à 15 ans). Elle dure 8 à 11 ans en moyenne dans le cas du VIH-1 et peut durer 15 ans dans le cas du VIH-2. Mais peut être brève, 3 ans seulement. Le virus se réplique continuellement dans les gîtes lymphoïdes. Les lymphocytes TCD4 vont lentement, mais inexorablement, diminuer. Il peut y avoir des adénopathies (tuméfaction d'un ou plusieurs ganglions lymphatiques) disséminées.

VI.3. La phase clinique

La phase clinique correspond au SIDA proprement dit. Pendant cette période le nombre de lymphocytes TCD4 devient inférieur à 200 cellules / mm³. Le syndrome d'immunodéficience apparaît et ses manifestations les plus fréquentes sont les infections opportunistes sévères.

Une infection opportuniste est une infection grave provoquée par un micro-organisme, habituellement non pathogène mais qui profite de l'opportunité offerte par l'immunodéficience. La mort survient entre 9 mois à 2 ans en absence de traitement.

CHAPITRE II. LE DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE ET MONITORING BIOLOGIQUE DU VIH

I. LES DIFFERENTS TECHNIQUES DE QUANTIFICATION DU VIH-1

I.1- Les techniques de diagnostic de l'infection à VIH/SIDA

Deux types de techniques sont utilisés : les techniques indirectes permettent la détection des anticorps et les techniques directes permettent la mise en évidence des virus (par culture), des protéines virales (Ag p24) et du génome viral (ARN plasmatique ou ADN proviral).

Chez l'adulte, le diagnostic de l'infection à VIH repose essentiellement sur la mise en évidence des anticorps par sérologie sauf dans le cas d'infection par un variant non détectable par les troussees disponibles et dans le cas primo-infection (ARN viral, Ag p24). Et chez les nouveaux nés, le diagnostic de l'infection se fait par l'utilisation des techniques directes (ARN plasmatique ou ADN proviral) (<http://www.sante.dz/jmsida2014/guidenational.pdf> 2013) consulté 15juillet 216.

I.2- Les techniques de suivi virologique

Le test de charge virale constitue la méthode de référence pour le suivi des patients vivant avec le VIH sous traitement ARV. Elle permet de mesurer la réplication virale et de prédire l'évolution de l'infection. La quantification de la charge virale est devenue une recommandation forte de l'OMS pour le monitoring des patients vivant avec le VIH.

Les technologies de charge virale peuvent être divisées en techniques basées sur les acides nucléiques (qui détectent et amplifient les acides nucléiques). Dans le contexte des pays à ressources limitées, ce sont les technologies de charge virale basées sur l'amplification des acides nucléiques qui sont les plus utilisées (**ONUSIDA, 2013**) http://www.sante.dz/jmsida2014/guide_national.pdf2013.

Les plateformes de charge virales disponibles sont :

✓ La technologie de Roche Cobas AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1

Le test Roche® CAP/CTM HIV-1 est un test quantification consistant à la détection simultanée de l'ARN du VIH-1 et du contrôle interne (CI). Le test cible des régions hautement conservées du gène *gag* P24 et la partie LTR du VIH-1. Ce test combine

l'extraction automatisée l'ADN à une étape d'amplification-détection sur un système entièrement intégré.

✓ **La technologie Abbott RealTime HIV-1® (Abbott), des laboratoires Abbott**

Abbott RealTime HIV-1 quantification est un dosage in vitro par amplification d'acides nucléiques du HIV-1 (ARN ou ADN). C'est une technique qui est entièrement automatisée et amplifie la région pol/intégrase et la détection se fait à l'aide de sonde marquée partiellement double brin.

✓ **La technologie de NucliSens EasyQ HIV v1.1®**

La technologie de NucliSens EasyQ HIV v1.1® des laboratoires Biomérieux permet la quantification de l'ARN viral par amplification-détection d'une séquence cible du gène *gag* selon les instructions du fabricant (Biomérieux, Lyon, France). L'extraction utilise le principe de la technique de Boom grâce à de particules de silice magnétique ajoutées au lysat. Une amplification de type NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) de l'ARN viral et du contrôle interne se feront simultanément avant la détection en temps réel à l'aide de balises moléculaires (Ndiaye O, 2015).

✓ **La technologie BIOCENTRIC**

Le kit générique HIV-1 quali (BIOCENTRIC, Brandol, France) réalise une amplification par RT-PCR ciblant les régions *gag* et LTR du génome du HIV et détection se fait grâce à une sonde de type Taqman. Cette technique détecte les groupes M, O et plusieurs CRFs. L'extraction se fait de façon manuel avec le Qiagen spin column (QIAamp Viral RNA Mini Kit, Qiagen, Courtaboeuf, France) et l'amplification se fait grâce à l'automate PRISM 7300 (Applied BioSystems, Foster City, CA, USA) (Ndiaye O, 2015).

✓ **VERSANT™ kPCR Molecular System (Siemens Healthcare Diagnostics, Inc.)**

Le test Versant HIV de Siemens est une technique entièrement automatisée. L'extraction utilise des billes magnétiques après une étape de lyse avec la protéinase K et un tampon chaotrope. L'amplification est une RT-PCR ciblant la région pol et la détection se fait par des sondes de type Taqman. Le test Versant HIV de Siemens utilise la technologie "one-room" et détecte les VIH-1 groupes M, O et les CRFs.

✓ **The artus™ HIV-1 RG/QS-RGQ RT-PCR System (QIAGEN N.V.)**

Le test Artus de QIAGEN utilise une amplification par RT-PCR en temps réel ciblant la région LTR. L'extraction peut être automatisée grâce à la plateforme d'extraction automatique : le système QIASymphony™ SP/AS. L'extraction peut également être manuelle avec l'automate : le système QIAamp® DSP Virus Kit

❖ Les POC en développement (Operational Characteristics of Diagnostic Platforms)

(https://drive.google.com/file/d/0B_MX8gAwrFucbmhnb18za0tuSEk/view) consulté le 30 novembre 2016

Type de technologie	Système de purification, d'amplification et de détection portable basé sur le banc, basé sur le NAT ARN du VIH
Intérêt	Mesure de la charge virale quantitative du VIH-1, des groupes M, N et O et de l'ARN du VIH-2
Temps d'exécution	Environ 30 à 60 minutes
Capacité	Maximum de ~ 10 échantillons par jour
Débit par technicien / par jour	~ 10 échantillons par technicien par jour; Aucune capacité de traitement par lots; Marche à pied.
Échantillon nécessaire et stabilité	<p>-25 µl de sang capillaire (! Ngerstick) injecté directement dans le collecteur d'échantillon contenu</p> <p>-Dans la cartouche dédiée. Alternativement, on peut utiliser 25 µl de sang ou de sang veineux</p> <p>-Dans le dispositif. Pour le sang veineux, aucun dosage n'est nécessaire sur la cartouche. Cartouche</p> <p>-Contenant l'échantillon peut être stocké et expédié si nécessaire, car l'échantillon devrait être</p> <p>-Stable pendant des semaines.</p>
Préparation des échantillons et complexité du protocole	<p>-Aucune préparation d'échantillon n'est requise. Pour le sang capillaire : (i) lancette ; (Ii) mèche entière</p> <p>-Sang directement dans la cartouche ; (Iii) fermer la cartouche ;</p>

	(Iv) insérer la cartouche dans l'analyseur ; (V) -Entrer l'opérateur et l'ID d'échantillon ; (Vi) l'analyse commence automatiquement ; (Vii) retirer la cartouche -De l'analyseur et en disposer ; Et (viii) lire le résultat de l'écran. Temps de marche -Devrait être ~ 10 minutes.
Stabilité des réactifs	Les réactifs lyophilisés ne nécessitent aucune réfrigération. Stable pendant 12 mois à 2 - 30 ° C
Coût / test	À déterminer
Coût / instrument	à déterminer
Statut réglementaire	Alere demandera l'approbation réglementaire pour le marquage CE-IVD et l'approbation de la FDA en 2012 et 2013
Poids Dimensions physiques (analyseur uniquement) (L x H x P)	LH MCT -Longueur : 28 cm (11 po) -Hauteur : 17 cm (6,7 po) -Profondeur: 17 cm (6,7 po)
Fournitures de tiers	Pour les échantillons capillaires: lancettes stériles, tampons d'alcool, écouvillons secs (également disponible chez Alere)

II. TRAITEMENT

A l'heure actuelle, aucun traitement ne permet d'éradiquer le VIH de l'organisme. Il existe cependant des traitements qui diminuent fortement la quantité de virus dans le sang. Ce sont les « traitements antirétroviraux ». Une personne qui commence un traitement doit le poursuivre toute sa vie.

Au fil du temps, grâce aux progrès scientifiques, les traitements sont devenus plus simples et plus efficaces.

Les traitements antirétroviraux sont toujours prescrits en association, et le plus souvent en trithérapie, c'est-à-dire en combinaison de 3 molécules.

En 2015, l'OMS a publié des recommandations sur le moment indiqué pour démarrer un traitement antirétroviral et sur la prophylaxie préexposition du VIH. Elles préconisent que toute personne infectée par le VIH doit commencer le traitement antirétroviral dès que possible après que le diagnostic soit posé (Aide-mémoire N°360 Juillet 2016). Avec cette recommandation de « traiter tout le monde », l'OMS supprime toutes les limitations aux conditions requises pour pouvoir bénéficier du traitement antirétroviral quand on est porteur du VIH ; le traitement est désormais justifié dans toutes les populations et dans toutes les tranches d'âge (OMS 2016).

Cet usage généralisé du traitement antirétroviral s'appuie sur les résultats récents d'essais cliniques confirmant que son administration précoce permet de garder les patients en vie, en meilleure santé, et diminue le risque de transmission aux partenaires (<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/hiv-treat-all-recommendation/fr/>) consulté le 23 novembre 2016.

Pour cela, le traitement antirétroviral doit être débuté avant que le taux de CD4 ne soit trop abaissé, de manière à éviter les infections opportunistes et à préserver le devenir à long terme de la personne. De nombreux facteurs sont à prendre en compte pour décider du moment d'initiation du traitement. Idéalement, celui-ci se prépare à l'avance, et se discute sérieusement lorsque le taux de CD4 passe en-dessous de la barre des 500 CD4/mm³ (ARCAT 2015). Ceci s'applique :

- chez tout patient séropositif pour le VIH présentant une maladie symptomatique (stades OMS 3 et 4), quel que soit le niveau de CD4 ou lorsque leur dosage n'est pas disponible. Il est donc tout à fait possible de débiter des TARV même si le dosage des CD4 n'est pas disponible ;
- chez tout patient séropositif pour le VIH ayant un nombre de lymphocytes CD4 $\leq 500/ \text{mm}^3$ ou compris entre 350 à 500/mm³, qu'il y ait ou non des symptômes.

Fin 2015, 17 millions de personnes vivant avec le VIH bénéficiaient de la thérapie antirétrovirale dans le monde, soit 46% [43% - 50%] de couverture mondiale (Aide-mémoire N°360 Juillet 2016).

Sur la base des nouvelles recommandations de l'OMS, pour traiter toutes les personnes vivant avec le VIH et proposer les antirétroviraux comme moyen supplémentaire de prévention aux personnes exposées à un risque «important», le nombre des personnes remplissant les

conditions requises pour ce traitement passera de 28 millions à 37 millions. L'extension de l'accès au traitement est au cœur d'une nouvelle série de cibles pour 2020 ayant pour but de mettre fin à l'épidémie de sida d'ici à 2030 (Aide-mémoire N°360 Juillet 2016).

II.1. Le choix thérapeutique (OMS, 2015)

Le traitement ARV administré est basé sur les recommandations de l'OMS. Dans les pays à ressources limitées comme le Sénégal, un TARV de 1ère intention doit comporter un INNTI plus deux INTI dont l'un doit être la Zidovudine (AZT) ou le Tenofovir. Le tableau 2 ci-dessous présente les schémas de TARV de première intention privilégiés et les autres options conseillées chez l'adulte, chez la femme enceinte ou allaitant et chez l'adolescent.

Tableau 1 : Schémas de TARV de première intention privilégiés et autres options conseillées (OMS 2015)

TARV de première intention	Schémas de première intention privilégiés	Schémas de première intention alternatifs
Adultes	TDF + 3TC (ou FTC) + EFV	AZT + 3TC + EFV (or NVP) TDF + 3TC (ou FTC) + DTG TDF + 3TC (ou FTC) + EFV TDF + 3TC (ou FTC) + NVP
Femmes enceintes ou allaitantes	TDF + 3TC (ou FTC) + EFV	AZT + 3TC + EFV (ou NVP) TDF + 3TC (ou FTC) + NVP
Adolescents	TDF + 3TC (ou FTC) + EFV	AZT + 3TC + EFV (or NVP) TDF (or ABC) + 3TC (ou FTC) + DTG TDF (or ABC) + 3TC (ou FTC) + EFV TDF (or ABC) + 3TC (ou FTC) + NVP

En cas d'échec de la première intention de traitement, l'OMS préconise un changement de schéma passant de la première à la deuxième intention qui, en cas d'échec, la troisième intention est mise en route (tableau 2). Au Sénégal le schéma de 3^{ème} intention n'est pas encore disponible ou très rare

**Tableau 2 : Changement de schéma ARV en cas d'échec thérapeutique
(OMS 2015)**

Population	Schéma de 1 ^{ère} intention	Schéma de 2 ^{ème} intention	Schéma de 3 ^{ème} intention
Adultes et adolescents	2 INTI + EFV	2 INTI + ATV/r ou LPV/r	DRV/r + DTG (ou RAL) ± 1–2 INTI
		2 INTI + DRV/r	
	2 INTI + DTG	2 INTI + ATV/r ou LPV/r	DRV/r + 2 INTI ± INNTI
		2 INTI + DRV/r	Optimisation du schéma thérapeutique à l'aide du profil génotypique
Femmes enceintes/allaitantes	2 INTI + EFV	2 INTI + ATV/r ou LPV/r	DRV/r + DTG (ou RAL) ± 1–2 INTI
		2 NRTI + DRV/r	

La prise en charge thérapeutique des PvVIH doit être accompagnée par un monitoring virologique, plus particulièrement par une quantification de la charge virale afin de s'informer sur l'efficacité du traitement.

CHAPITRE III : UTILITE DU PAPIER BUVARD DANS LE MONITORING VIROLOGIQUE

Le papier buvard est un papier poreux capable d'absorber par capillarité une quantité de liquide. Le prélèvement sur papier buvard (DBS) est une approche simple et efficace ayant été utilisé dans le diagnostic de nombreuses maladies. Depuis les années 1960, il a été utilisé pour l'étude de plusieurs pathologies chez les nourrissons (Guthrie R, 1963). Au fil du temps le DBS a été utilisé non seulement pour collecter le sang des nourrissons mais également celui des adultes à des fins d'analyses sérologiques (Gwinn M et al, 1992) ou moléculaires (Maritz J et al, 2012) ainsi que dans le suivi virologique des PVVIH (Personnes Vivant avec le VIH) (Rottinghaus EK et al, 2012). C'est une méthode de prélèvement facile, souple et moins couteuse pour la mise en œuvre des programmes d'étude du VIH dans les pays à ressources limitées. Elle trouve son application dans les études de séroprévalence, de détermination de la transmission mère enfant du VIH, de la détermination de la charge virale, des tests de génotypage et de résistance aux antirétroviraux.

Les nombreuses difficultés rencontrées au cours des prélèvements et traitements des échantillons veineux sur tube (prélèvement de sang invasif, volume de sang insuffisant, nombre limite de laboratoire de référence, la séparation lymphocytaire dans les 6 heures qui suivent le prélèvement, la rupture de la chaîne de froid etc.) ont favorisé l'utilisation du papier buvard comme support alternatif de prélèvement de sang pour le suivi virologique des PVVIH dans les pays à ressources limitées. Cette méthode performante de prélèvement, de réalisation facile, permet de pallier à ces nombreuses difficultés liées aux prélèvements veineux sur tubes. Ainsi l'utilisation du DBS au Sénégal, a permis de faciliter la prise en charge des PVVIH en milieu décentralisé.

I. Propriétés du papier buvard

Le papier buvard doit présenter certaines propriétés (voir figure 11)

- la surface doit être lisse et résistante, sans fibre perdue ;
- doit être résistant aux acides et bases fortes ;
- doit avoir une composition en cendre (extrêmement faible) (0,006%) ;
- être fabriqué à partir de linters de coton et de cellulose ;

- doit avoir une certaine capacité de rétention et une résistante accrue à l'humidité.

II. Les avantages du papier buvard

L'utilisation du papier buvard présente de nombreux avantages :

- facile à manipuler et à transporter des zones reculées vers le laboratoire de référence ;
- possibilité d'envoi par la poste ;
- conservation facile à température ambiante (jusqu'à 37°C ou plus), donc adapté aux températures tropicales ;
- moins onéreux donc accessible pour les pays à ressources limitées ;
- les études ont montré une bonne corrélation avec le sang total en tube pour l'extraction de l'ADN proviral dans le diagnostic néonatal et dans la caractérisation génétique du VIH ;
- la stabilité des anticorps et de l'ADN dans le sang total sur papier buvard a été largement prouvée ;
- des études de génotypage ont montré une bonne corrélation avec le plasma et une bonne stabilité des ARN avec les DBS conservés à -20°C pendant 4 ans et ceux conservés à -4°C pendant 1 an (les DBS ont été utilisés avec succès dans beaucoup de travaux pour la quantification de l'ARN viral)



Figure 11 : Photographie de papier buvard

PARTIE II : TRAVAIL EXPERIMENTAL

CHAPITRE I : METHODOLOGIE

1. CONTEXTE

1.1. Informations générales sur le Sénégal

La République du Sénégal est située dans la partie la plus occidentale du continent Africain dans la zone soudano sahélienne comprise entre 12°8 et 16°41 de latitude Nord et 11°21 et 17°32 de longitude Ouest. D'une superficie de 196.722 km², il est limité au Nord par la Mauritanie, au Sud par la République de Guinée et la Guinée Bissau, à l'Est par le Mali et à l'Ouest par l'Océan Atlantique. Le Sénégal compte des circonscriptions administratives (14 régions, 45 départements et 117 arrondissements) et des collectivités locales (45 départements et 557 communes) (<http://www.au-senegal.com/les-regions-du-senegal,3605.html>) consulté 17 janvier 2016.

En 2015, sa population était estimée à 13.508.715 habitants avec un taux d'accroissement moyen annuel de 2,48%. Le nombre des femmes est légèrement plus élevé que celui des hommes dont 49,9% d'hommes et 50,1% des femmes.

Cette population se caractérise par sa jeunesse : l'âge moyen de la population est de 22,4 ans et la moitié de la population a 18,7 ans (âge médian). La population rurale y apparaît plus jeune avec un âge médian se situant à 15 ans contre 21 ans en milieu urbain. Cette population croît rapidement, avec un indice de fécondité de 5 enfants par femme. Les personnes en âge d'activité représentent 53,8% et celles âgées de 60 ans et plus constituent 5,2%. (http://www.ansd.sn/publications_SES.html) (Site consulté en avril 2013). Les taux de natalité et de mortalité sont respectivement : 35,09 naissances/1.000 habitants et 8,65 décès/1.000 habitants (http://www.indexmundi.com/fr/senegal/population_profil.html) consulté 23 novembre 2016.

1.2. Présentation du cadre d'étude

Notre étude a pour cadre le laboratoire du Centre Régionale de Recherche et de Formation à la Prise en charge Clinique (CRCF) de CHU de FANN et le laboratoire de Bactériologie-Virologie (LBV) du CHU Aristide Le Dantec de Dakar/Sénégal. Ces laboratoires ont pour vocation le diagnostic biologique des infections bactériennes et virales, la recherche et la formation dans le domaine de la bactériologie et de la virologie. Ces sont des centres de référence des infections sexuellement transmissibles et un centre collaborateur ONUSIDA

1.3. Type étude et Échantillonnage

Il s'agit d'une étude prospective comparative portant sur des échantillons de plasma et de DBS collectés entre Avril et Mai 2016 au laboratoire du CRCF du CHU de FANN afin d'évaluer la CV. Notre échantillonnage est constitué de 52 échantillons de patients suivis ou bien référés au CRCF pour des tests de sérologies ou de CD4.

CHAPITRE II : MATÉRIELS/METHODES

1. MATÉRIELS/RÉACTIFS

1.1. Matériels

✚ Pour plasma:

Équipements et consommables

- Gants sans talc ;
- Embouts stériles à filtre p200 et p1000 ;
- Micropipettes de 50-200µl et 100-1000µl ;
- WellDeep Plates spécifique de m2000sp ;
- Embouts de 200 µl spécifique de m2000sp ;
- Appareil Abbott m2000rt pour la RT- PCR à temps réel.

✚ Pour DBS :

Le matériel requis se compose de :

- Hotte microbiologique ;
- Puncher ;
- Agitateur rotatif ;
- Une Centrifugeuse ;
- vortex ;
- Tubes de 15ml ;
- Sac plastique avec possibilité de le sceller ;
- Dessicants ;

-Tampon de lyse.

➤ **Matériel pour la confection des DBS**

Pour confectionner les DBS, il faut disposer des éléments suivants (figure 12).

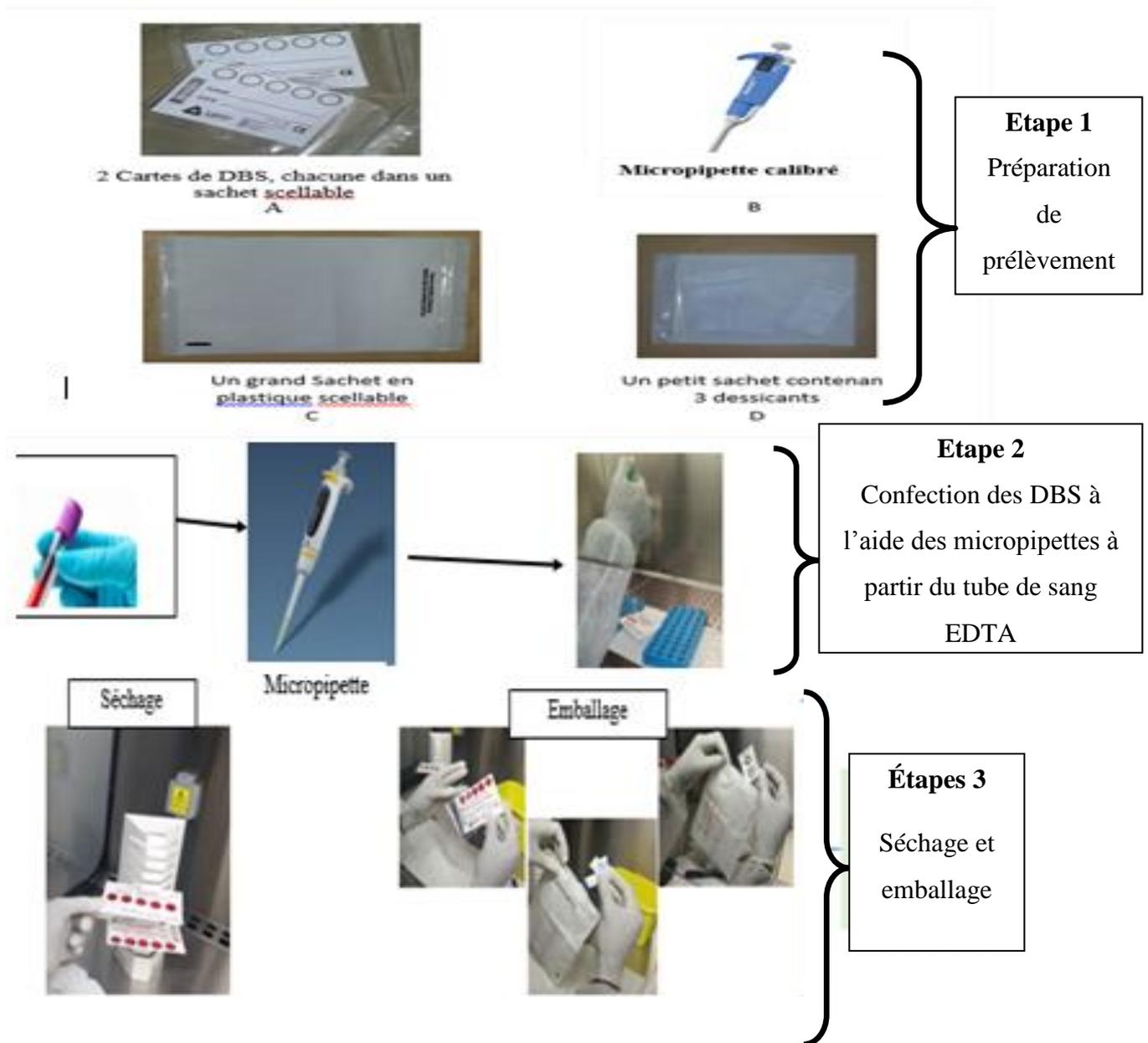


Figure 12 : Photo des différents étapes de la confection des DBS

✚ **Pour la numération des TCD4 :**

- Des Tubes EDTA de 4ml ;
- Une Centrifugeuse ;

- Un Vortex, et une Perforeuse ;
- Cytomètre à flux : le FACS Count et son kit comprenant le tampon CD4-CD8 et un fixateur.



Figure 13: : FACS Count

<http://www.bdbiosciences.com/sg/instruments/facscount/index.jsp> consulté le 23 novembre 2016

✚ La charge virale

La charge virale (Plasma/ DBS) a été déterminée pour ceux dont le test était positif pour le VIH et ayant un taux de CD4 inférieurs à 350 cellules/ mm³, afin de suivre la multiplication de la particule virale et/ou l'évolution de la maladie, en utilisant Abbott m2000 pour l'amplification et la détection en temps réel (ABBOTT) (figure 14A et B).



Figure 14 : Appareil Abbott m2000sp Figure 14B : Real Time PCR m2000rt (Abbott)

(<http://www.chemiereport.at/echtzeit-test-fuer-hepatitis-b-erhaelt-ce-kennzeichen>) consulté le 23 novembre 2016

1.2. Réactifs et solutions

- Abbott Real Time HIV-1 Sample Preparation Kit;
- Abbott Real Time HIV-1 amplification Reagent Kit;
- Tampon de Lys ;
- Des calibrateurs et contrôles internes et externes VIH-1 négatif ; VIH-1 faiblement positif ; VIH-1 fortement positif ;
- Les microparticules ;
- Tampons de lavage mWash-1 et mWash-2 ;
- Le master mix : coffret réactifs contenant le réactif d'activation VIH-1 (réactif 1), thermostable rTth DNA polymérase Enzyme (réactif 3) et le réactif d'oligonucléotides VIH-1 (réactif 2) ;
- Hypochlorite de sodium 1%, Eau distillée, Alcool...

2. METHODES

2.1. Prélèvement

Les prélèvements ont été réalisés du lundi au vendredi entre 7 heures et 11 heures du matin sur des patients découverts VIH+ non traités ou bien en qui sont en échec de traitement ARV venus pour les examens biologiques de suivi.

Les prélèvements sont réalisés sur tube EDTA pour la numération du taux de CD4 et la charge virale plasmatique et ses prélèvements vont permettre également de confectionner les DBS chez les patients ayant donné leurs consentements sur l'étude de faisabilité du DBS pour la détermination de la charge virale VIH-1 ainsi que dans le suivi virologique des personnes vivants avec le VIH (PVVIH).

2.2. Numération CD4/CD8 :

✓ Principe :

Les CD4, spécifique détermine l'état immunitaire de la personne infectée en nombre absolu, le taux de CD4 est important. Ils se préservent les répertoires, c'est-à-dire que les Cd4 sont spécialisés contre les infections, des agresseurs étrangers en particulier et que chaque Cd4 est spécifique et dirigé contre une cible particulière. Néanmoins au cours de l'infection par le VIH, les CD4 sont détruits de manière asymétrique. Ainsi, il y a des lignées de CD4 qui souffrent plus que d'autres.

✓ Technique :

2.2.1. Préparation des échantillons

- 1- Marquer la paire de tube des réactifs (CD4 - CD8)
- 2- Vortexer les réactifs renversés pendant 5 secondes
- 3- Vortexer les réactifs debout pendant 5 secondes
- 4- Perforer les tubes de réactif en utilisant la station de perforation
- 5- Bien homogénéiser par le rotateur, chaque tube d'échantillon prélevé dans un tube de prélèvement EDTA.
- 6- Prélever 50 µl de sang total dans un tube d'échantillon et ajouter les dans chacun des tubes du réactif
- 7- Refermer les tubes et vortexer le réactif pendant 5 secondes
- 8- Incuber pendant 60 à 120 mn à température ambiante et à l'abri de la lumière

- 9- Enlever les bouchons des tubes et ajouter 50 µl de la solution de fixation dans chaque tube
- 10- Refermer chaque tube et vortexer les pendant 5 seconde
- 11- Lire dans les 48 heures ou directement passer au lecteur (Analyse).

2.3. Confection des DBS (figure 12) et Plasmas:

- ✓ Les prélèvements sur les tubes EDTA sont homogénéisés et 50 µl de sang total est déposé sur chaque cercle sur le DBS (au total 5 cercles) après étiquetage. Les DBS sont ensuite séchés sous la hotte à l'abri de la lumière jusqu'au lendemain. Tout en évitant de toucher les spots, les DBS sont par la suite mis dans les sacs plastiques individuels scellés en présence de dessiccants et d'un indicateur d'humidité. Et enfin, les DBS sont mis à - 80°C jusqu'à acheminement au Laboratoire de Bactériologie Virologie du CHU Le Dantec.
- ✓ La séparation lymphocytaire a lieu au plus tard 6 heures après le prélèvement. Les tubes EDTA sont centrifugés à 2000 tr/mn pendant 10 minutes et les plasmas sont récupérés dans des cryotubes bien identifiés. Les cryotubes sont par la suite rangés dans des cryoboîtes et conservés à - 80°C jusqu'à acheminement au Laboratoire de Bactériologie Virologie du CHU Le Dantec

2.4. Acheminement et conservation

Les DBS et plasmas sont acheminés au laboratoire de Bactériologie Virologie dans des glacières en présence d'Ice-pack avec la voiture dédié du service. Une fois au laboratoire de référence, la conformité du prélèvement est vérifiée, les échantillons sont traités immédiatement ou bien conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

2.5. Charge virale par la technologie Abbott RealTime HIV-1 ® (m2000sp/rt)

Abbott Real Time HIV-1 assay (Abbott molecular diagnostics, Wiesbaden, Germany) est un test in vitro d'amplification par RT PCR en temps réel de l'ARN viral ciblant la région de l'intégrase du gène pol hautement conservé grâce à une sonde d'hybridation. L'amplification est couplée à la détection en temps réel utilisant une sonde partiellement double brin marquée. Ce test détecte les VIH -1 groupes M, N, O et P et plusieurs CRF. L'extraction entièrement automatisée a été réalisée sur 600 µl de plasma avec l'automate Abbott m2000sp et

l'amplification suivie d'une détection en temps réel avec l'analyseur Abbott m2000rt. Les limites de détection de la technique sont de 1.60 à 7.0 log₁₀ copies/ml.

D'abord, avant chaque manipulation, il consistera à inclure :

-Dans chaque échantillon, un contrôle interne (fourni dans le kit) qui sera extrait et amplifiée puis détecté en même temps que les échantillons à analyser.

-Dans chaque série, un contrôle négatif, un contrôle positif faible et un contrôle positif fort de charge virale connue (inclus dans le kit).

La première étape de la charge virale (**DBS/Plasma**) est l'extraction d'acide nucléique qui se fait en quatre étapes. Suivis par une étape amplification/détection en temps réel.

✓ **Extraction d'acide nucléique**

L'Extraction d'acide nucléique se passe dans l'automate d'extraction (m2000sp) et se fait par des étapes suivantes :

- La lyse des particules virales : se fait à l'aide de tampon de lyse qui assure la dénaturation des protéines, la lyse de capsid virale et l'inactivation des RNAses/DNAses ;
- La capture de l'ARN se fait à l'aide de microparticules magnétiques ;
- Suivis du lavage des acides nucléiques par wash1/Wash2 ;
- L'élution des ARN purifiés se fait par le tampon d'élution qui crée un détachement compétitif de l'ARN de la silice magnétique.

NB : A la différence du plasma, la charge virale sur DBS nécessite une première étape de lyse du DBS grâce à un tampon de lyse spécifique au DBS.

La lyse se doit être réalisée en utilisant une procédure standardisée. Deux spots de 50µl de chaque DBS/patients sont découpés avec un Puncher spécifique sous une Hotte microbiologique et placés dans un tube de 15ml contenant un tampon de lyse de 2 ml. Les tubes sont ensuite placés sur l'agitateur rotatif et laissés en incubation pendant 2 heures. Ils sont ensuite tourner pendant dix minutes sur une centrifugeuse à 2500t/min.

Enfin les DBS peuvent être chargés dans l'automate d'extraction pour subir le même processus que le plasma.

✓ **Amplification et détection de l'acide nucléique**

Les tests Real Time sont basés sur une amplification par RT-PCR en temps réel grâce à une sonde d'hybridation (sonde partielle double brin). Donc, en plus de l'étape d'amplification, il y a une étape de détection qui se fait dans chaque cycle de PCR. L'amplification se fait dans l'automate d'amplification (m2000rt).

Le seuil de détection pour m2000 est de 40copies/ml et les résultats de la charge virale peuvent être exprimés en log copies/ml ou bien en copies/ml.

✓ Critères de validité des résultats de m2000rt

Pour qu'un résultat soit rendu valide, il faut que :

- les contrôles externes (négatif, faible et fort) soient dans les intervalles de valeurs données par la notice du fabricant pour valider la série.
- Pour qu'un échantillon soit validé, il faut que le contrôle interne soit amplifié et quantifié dans les intervalles de valeurs données par la notice du fabricant.

En cas d'invalidité d'un échantillon ou d'une série d'échantillons, le ou les échantillons concernés de la série non validé est/sont testés à nouveau.

En cas d'invalidité d'une série de résultats, un contrôle de qualité est effectué par une nouvelle série sur un lot de six échantillons de la série non validé en utilisant le même lot de réactif. Ce contrôle de qualité devra reprendre entièrement toutes les étapes de la procédure.

- Si le problème persiste avec ce lot de réactif, nous devons reprendre les manipulations en changeant de lot.
- Si le problème persiste malgré ce changement de lot, nous avons alerté le service de maintenance technique pour une révision de la machine.

CHAPITRE III : RESULTATS/DISCUSSION

1. RÉSULTATS

1.1. Caractéristiques de l'échantillonnage

Notre échantillonnage est constitué de 52 échantillons, des personnes vivant avec le VIH-1, suivis dans la région de Dakar au niveau de CHU FANN. Tous ces échantillons ont fait l'objet d'analyse comparative des deux types de prélèvements : DBS contre Plasma.

Les âges étaient compris pour notre échantillonnage entre 7 et 74 ans, la médiane d'âge était de 28 ans. La population était composée de 30 Femmes contre 22 hommes.

Sur les 52 patients de notre échantillonnage, 18 sont des patients nouvellement infectés et non traité et 34 sont des patients sous traitement antirétroviral avec une médiane de suivi de 41 mois.

1.2. Résultats de CD4 :

Les CD4 ont été réalisés pour 52 patients. Elle a permis de répartir notre échantillonnage en quatre groupes en fonction de leur statut immunitaire :

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des valeurs de CD4

INTERVALLES	NOMBRE
≤ 200 cellules/mm ³	32
] 200 cellules/mm ³ - 350 cellules/mm ³]	16
≥ 350 cellules/mm ³	2
Invalides	2
TOTAL	52

Les valeurs de CD4 étaient comprises entre [1 cellule - 628 cellules] Avec une médiane de CD4 égale à 32.

- 32 patients ont des CD4 inférieurs à 200 cellules/mm³
- 16 patients ont des CD4 compris entre] 200 cellules/mm³ - 350 cellules/mm³]

- 2 patients ont des CD4 supérieurs à 350 cellules/mm³
- Et 2 échantillons invalides.

1.3. Résultats de charge virale plasmatique :

La charge virale plasmatique a été déterminée pour les 52 patients avec la plateforme m2000sp/rt des laboratoires Abbott et les résultats suivant ont été obtenus :

- 19 échantillons avaient des charges virales indétectables c'est-à-dire inférieures à 40 copies/ml.
- 3 échantillons avaient des charges virales faibles c'est-à-dire comprises entre 40 et 1000 copies/ml
- 10 échantillons avaient des charges virales modérées c'est-à-dire comprises entre 1000 copies/ml et 100 000 copies/ml.
- 20 échantillons avaient des charges virales élevées c'est-à-dire supérieurs à 100 000 copies/ml.

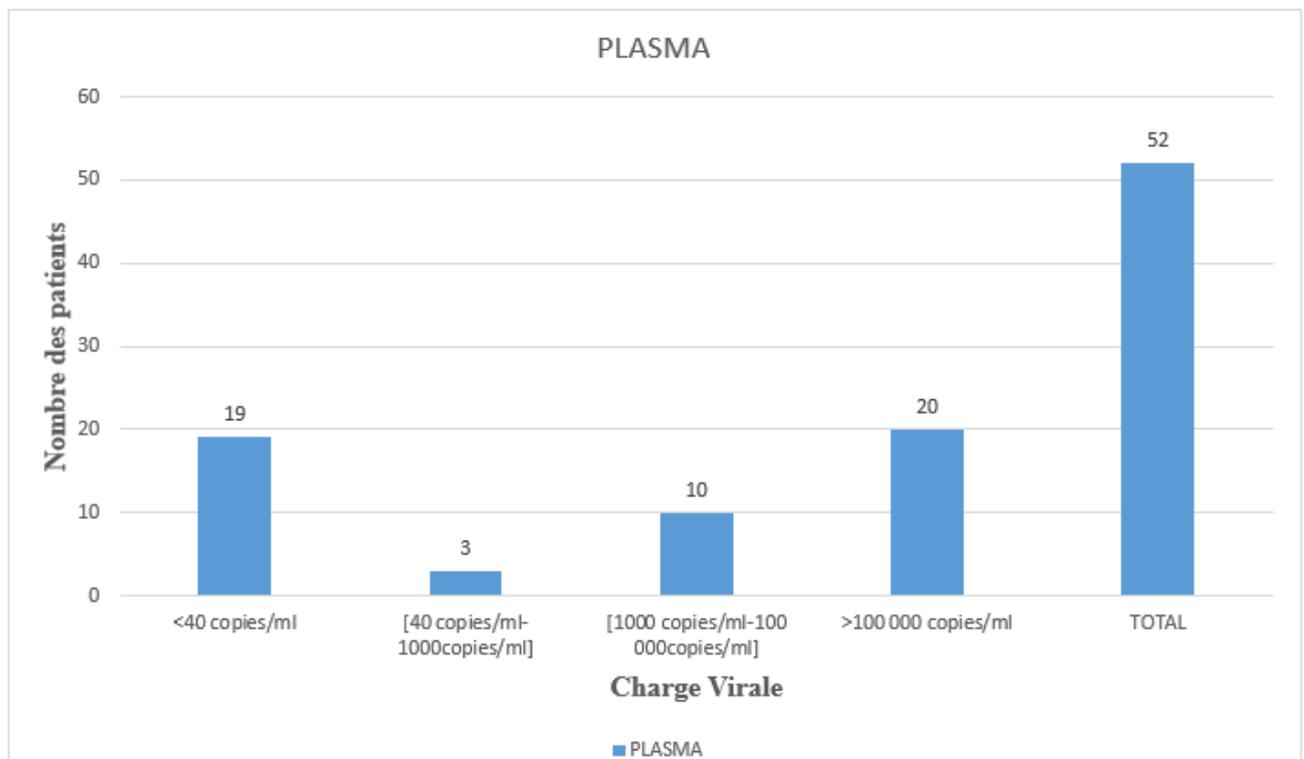


Figure 15 : Répartition des patients en fonction de la CV plasmatiques

1.4. Résultats de charge virale sur DBS

52 DBS de même patients ont été sélectionnée et testés sur le même Plateforme, 33 détectable avec les plasmas et 19 de non détectable, les résultats suivant ont été obtenus :

- 21 échantillons avaient des charges virales indétectables c'est-à-dire inférieures à 40 copies/ml (19 réellement indétectables avec PLASMA/DBS et 3 sont indétectables avec le DBS et détectable avec le Plasma).
- 3 échantillons avaient des charges virales faibles c'est-à-dire comprises entre 40 et 1000 copies/ml.
- 7 échantillons avaient des charges virales modérées c'est-à-dire comprises entre 1000 copies/ml et 10000 copies/ml.
- 18 échantillons avaient des charges virales élevées c'est-à-dire comprises entre 10000 copies/ml et 100000 copies/ml.
- 3 échantillons non amplifié

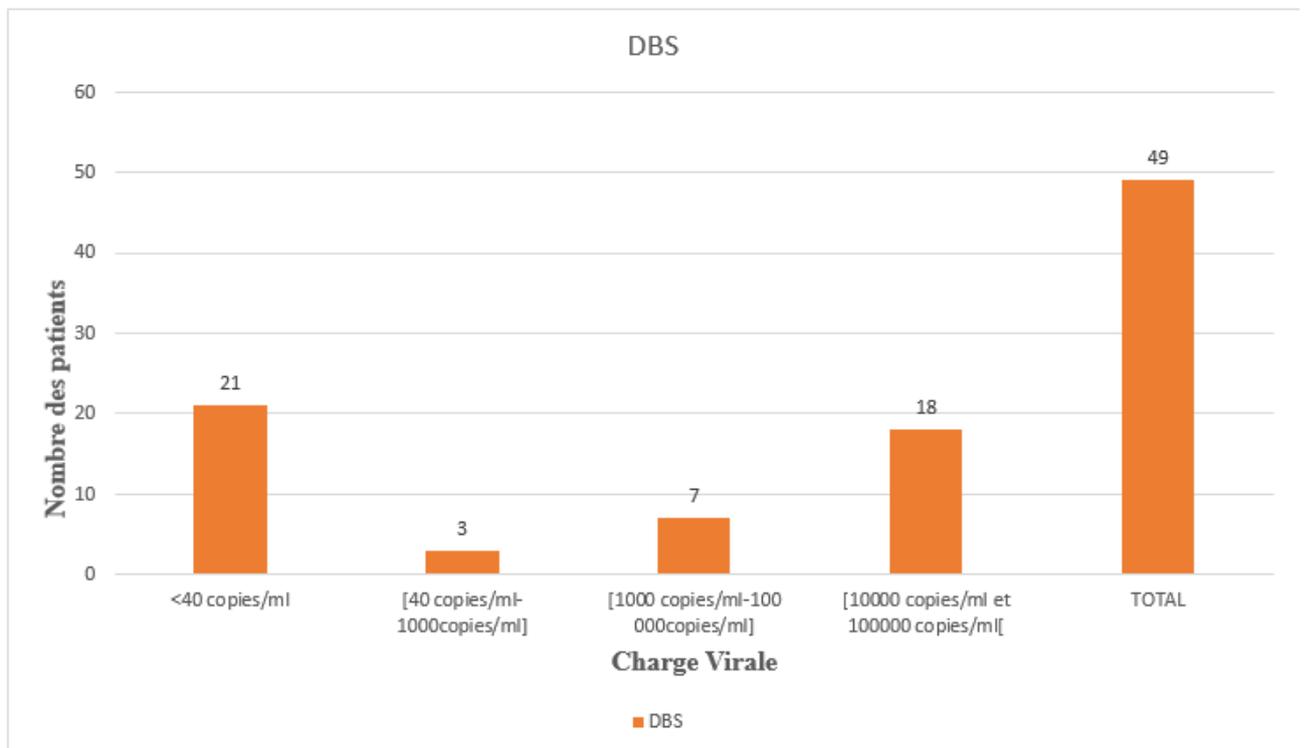


Figure 16 : Répartition des patients en fonction de la CV sur DBS.

1.5. La comparaison des valeurs de CV des deux techniques DBS Vs plasma

La comparaison des valeurs de charges virales sur les différents échantillons de DBS/Plasma a permis de retrouver : Pour le plasma, sur 52 échantillons testés, 19 échantillons avaient des charges virales inférieures à 40 copies/ml (Indétectable) et 33 échantillons avaient des charges virales supérieures à 40 copies/ml (Déteçtables). Et pour les DBS sur les 52 testés, 21 étaient indétectables, 28 Déteçtables et 3 n'ont pas pu être amplifié.

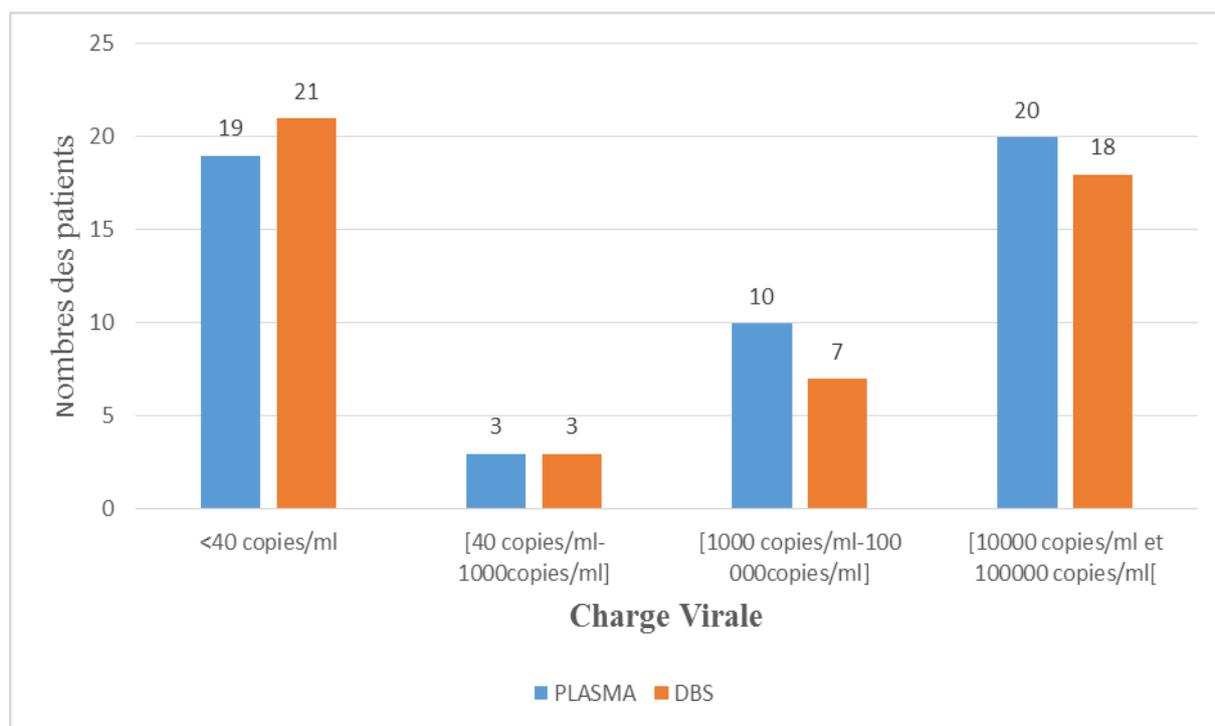


Figure 17 : Comparaison des valeurs de CV des deux techniques DBS contre plasma

La comparaison des valeurs de charges virales sur les différents échantillons de DBS a été à la fois qualitative et quantitative.

La comparaison qualitative permet de vérifier la concordance entre les deux types de prélèvement en termes de déteçtabilité ou non (tableau 2).

Tableau 4 : Similarité des deux méthodes en termes de détectabilité et de non détectabilité des valeurs de CV

DBS \ PLASMA	D	ND
D	28	3
ND	7	19

D : Détectable

ND : Non Détectable

- 28 échantillons ont été à la fois détectables pour les DBS et pour les Plasma
- 19 échantillons ont été à la fois indétectables pour les DBS et pour les Plasma
- 7 échantillons ont été détectables pour les Plasma et non détectables pour les DBS
- 3 échantillons ont été non détectables pour les Plasma et détectables pour les DBS

Après cette comparaison qualitative, une comparaison quantitative a été effectuée en calculant les différences de log des valeurs de CV des deux prélèvements (Plasma et DBS).

❖ **Corrélation et concordance des charges virales plasmatiques et DBS**

Les mesures de charge virale sur DBS des 49 échantillons ont été comparées à celles obtenues sur les prélèvements plasmatiques correspondants. Car 3 échantillons n'ont pas pu être amplifié et ne sont pas pris en compte dans l'analyse.

Les moyennes de charges virales sont de 3,81 log₁₀ copies/ml pour les plasmas et 3,22 log₁₀ copies/ml pour les DBS.

Les figures 18 et 19 présentent respectivement la droite de régression linéaire et l'analyse de concordance de Bland-Altman pour les résultats de CV DBS VS Plasma.

La régression linéaire comparant les valeurs CV obtenus en testant DBS par rapport au plasma en utilisant l'Abbott Real Time HIV-1. L'analyse de la droite de régression linéaire entre les valeurs de CV de DBS et plasma a donné un coefficient de corrélation de **R= 0,92** et une pente à **0,73** et l'interception en 0 (figure 18).

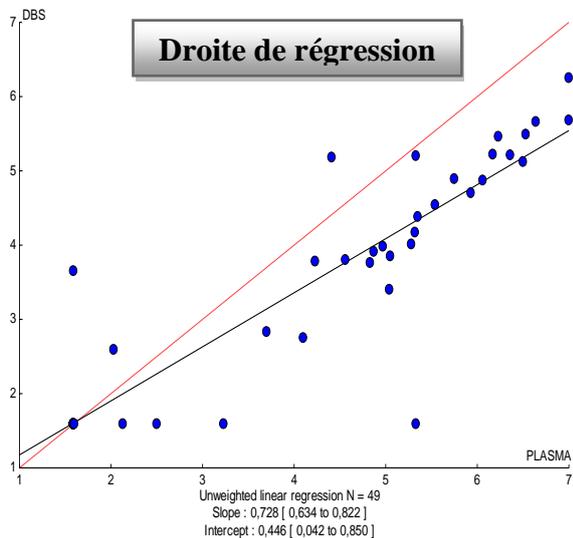


Figure 18 : Corrélation des charges virale ARN VIH+ plasmatique et DBS

L'analyse de la concordance entre les deux types de prélèvements et le graphe de Bland-Altman a donné un biais négatifs faible de **-0,589 [- 0,832 à - 0,347]** avec 2 échantillons sur les 49 qui sortent de l'intervalle de confiance (figure 18). Chaque point de données dans des courbes ci-dessous représente l'un des 49 échantillons d'étude individuels

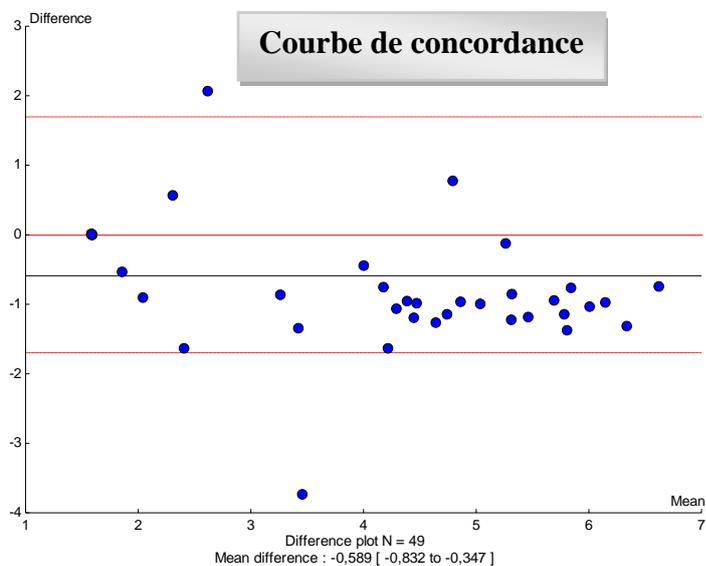


Figure 19 : Bland-Altman, différence entre les concentrations d'ARN VIH+ plasma et DBS

Au total, 35 échantillons présentaient des valeurs de CV concordantes entre les deux types de prélèvement contre seulement 14 qui présentaient une discordance selon leur différences de log et le diagramme de Bland-Altman.

➤ ECHANTILLONS D'INTERET CLINIQUE

D'après les différences de log de CV de deux technique (plasma vs DBS), **14/49 échantillons ont des différences de log supérieures à 0.5 log copies/ml avec :**

- ✓ **1 avec CV < 3 log ;**
- ✓ **3 avec CV [3 log - 5 log] ;**
- ✓ **et 10 avec CV > 5 log.**

Pour un échantillon avec CV<**3 log** et **10 avec CV > 5 log**, il n'y a pas d'incidence clinique pour ces 11 échantillons.

Tandis que pour les 3 échantillons avec une CV [**3 log - 5 log**] avec une valeur de CV de **3,74 ; 3,16 et 4,17**, il y a une incidence clinique.

2. DISCUSSION

Cette étude a porté sur 52 patients HIV-1 sous traitement antirétroviral ou des patients nouvellement dépistés. Cet échantillonnage est constitué de 30 femmes (56,7 %) et 22 hommes (43,1 %) soit un sexe ratio de 1,36.

Les CD4 ont été réalisés au cours de notre étude et les 52 patients retenus avaient des taux de CD4 inférieurs à 350 cellules. Des faibles taux de CD4 (> 200 cellules) indiquent un stade avancé de la maladie et une immunodéficience.

Pour la réalisation de la charge virale, les échantillons utilisés à cet effet étaient des DBS et des plasmas. Le DBS a également été recommandé par l'OMS pour le diagnostic précoce des enfants nés des mères séropositives à travers le monde mais surtout en Afrique. Il a été également utilisé pour la détermination de la charge virale (**Kane CT et al, 2008 ; Vidya M et al, 2012**), dans la détection de l'antigène p24 et la numération des lymphocytes T CD4 (**Amellal B et al, 2007**) mais aussi dans les tests de génotypage (**Charpentier C et al, 2011**).

Dans notre étude, 50 µl ont été utilisés par spot pour les DBS et dans la plupart des études qui ont permis d'évaluer la charge virale sur DBS, un volume de 50 µl obtenu avec une micropipette calibrée a été retenu comme suffisant et idéal pour la quantification des acides nucléiques viraux (**Kane CT et al, 2008**).

En 2013 un travail a été mené aux USA par **Rottinghaus et coll**, où les prélèvements étaient réalisés avec 100 µl de sang total au lieu de volume de 50µl (**Rottinghaus EK et al, 2012**). Dans l'étude de **Johannessen et coll**, le volume de dépôt était de 75 et 80 ul de sang total (**Johannessen A et al, 2011**). Après confection, les DBS ont été séchés à température ambiante pendant au moins 24h et à l'obscurité avant l'emballage comme dans la plupart des travaux publiés (**Andreotti M et al, 2010/Ouma KN et al, 2013**).

Dans notre étude, les prélèvements ont été conservés à -80°C et aux USA en 2013, dans une étude de résistance aux ARV, des conditions de conservations similaires ont été utilisés (**Rottinghaus E, 2013**).

Cependant la température et le temps de conservation ne sont pas toujours les mêmes dans les différents travaux. **Kane et coll**, dans leur étude de quantification de l'ARN du VIH-1 sur DBS par la technique NucliSENS EasyQ, ont conservé leur DBS à 37°C pendant 8 et 15 jours (**Kane CT et al, 2008**).

Toutefois, en 2012 Arredondo et coll, dans une étude de comparaison de CV entre plasma et DBS, ont conservé et stocké leur DBS et plasma à -20°C jusqu'à l'utilisation (Arredondo M *et al*, 2012). Plus la température est basse et plus l'ARN du VIH se conserve mieux.

En 2012, des études similaires ont été menées par Arredondo et al, et ont évalué le DBS contre plasma sur Abbott m2000, et ils ont obtenu une bonne corrélation de $r=0,91$. Marconi M. et al en 2009 ont également évalué l'utilisation des DBS sur Abbott Real-Time et ont obtenu une corrélation de 0,882. En 2012 également, des études menées par DIOUARA et al. A montré une corrélation CV Plasma contre DBS de 0,81 et en 2009 Mbida et al, ont obtenu une corrélation égale $r=0,889$ et qui porté sur 49 échantillons de DBS/plasma.

Notre échantillonnage est constitué de 52 paires d'échantillons. Cette population était inférieure à la population d'étude de Kébé et coll en 2013 à Dakar et celle de Salou et coll au Togo en 2016 portant respectivement sur 125 et 283 échantillons mais inférieure à celle de Zanoni et coll en 2012 avec 880 échantillons (Zanoni BC, 2012).

Dans notre étude, la population était composée en majorité de femmes (57,7%), même distribution observée dans l'étude de Lubega et coll (Lubega et al, 2010) avec 53% de femmes. L'âge n'a pas été renseigné pour certains et pour ceux dont l'âge est connu, la médiane d'âge était de 8 ans, valeur supérieure à celle retrouvée dans la série de Kébé et coll en 2013 et dans la série de Isaakidis et coll en 2009 qui étaient respectivement de 7 et de 6 ans mais proche de celle retrouvée (8,9 ans) dans la série de Zoufaly et coll (Zoufaly A, 2013).

CONCLUSION

Le VIH responsable du SIDA, constitue un véritable problème de santé publique touchant adultes, adolescents et enfants avec des prévalences considérablement élevées en Afrique subsaharienne même si au Sénégal, la tendance reste très faible de l'ordre de 0,7%. L'engagement de la prise en charge des personnes vivantes avec le VIH avec notamment le programme ISAARV (Initiative Sénégalaise d'Accès aux Antirétroviraux) au Sénégal a amélioré la qualité de vie de ces personnes.

La mesure de la charge virale est un paramètre essentiel dans la prise en charge des personnes infectées par le VIH. Le monitoring virologique peut être aussi amélioré par l'utilisation des DBS comme support de prélèvement. La confection de DBS est moins contraignant que le prélèvement de sang sur tube car son transport et la conservation exigent le maintien de la chaîne de froid entre le lieu de collecte et le laboratoire d'analyse. L'utilisation du DBS peut constituer ainsi un apport significatif dans le suivi des personnes vivant avec le VIH.

Notre étude a porté sur l'évaluation d'une technique de prélèvement sur la plateforme m2000. Ainsi, nous avons obtenu une bonne corrélation et une bonne concordance entre les DBS et le plasma. Les résultats de notre étude ont montré que les DBS utilisés comme support de prélèvement peuvent être une alternative technique aux prélèvements de sang sur tube.

Dans la lutte contre le VIH/SIDA, de nombreux progrès ont été menés en vue de réduire la prévalence et d'améliorer la prise en charge globale des personnes infectés et affectées par le VIH/SIDA. L'utilisation des DBS aussi bien pour le diagnostic que pour le suivi des personnes infectées trouve sa place dans notre contexte de pays à ressources limités, car offre un moyen de prélèvement, de transport, de conservation et de stockage facile et moins coûteux que le plasma.

Malheureusement, à ce jour, relativement peu d'études ont été menées en Afrique subsaharienne afin de déterminer si cette stratégie d'emploi des DBS est fiable et faisable sur le terrain. Ces résultats justifient, encore une fois, l'importance de l'utilisation de DBS à la place de plasma pour la quantification de la charge virale VIH-1. Ceci est d'autant plus important au niveau des pays à ressources limitées comme Sénégal et/ou au niveau des zones décentralisées afin de faciliter le diagnostic précoce pour les enfants et pour les personnes adultes sous traitement ARV vivant dans des zones décentralisées.

LES RECOMMANDATIONS

Ce travail nous a permis de formuler quelques recommandations suivantes.

- la formation des techniciens de laboratoire sur l'utilisation des DBS.
- la mise à disposition des Papier Buvard dans les laboratoires de référence pour le suivis de PVVIH,
- La mise à disposition dans les laboratoires et les centres de recherche des appareils, des équipements: des réactifs des laboratoires
- Faciliter le diagnostic au niveau des zones décentralisé.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1) Aide-mémoire N°360 Juillet 2016.
- 2) Alizé PROUST, 2013.Étude du transfert du VIH-1 des cellules présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T CD4 primaire et inhibition par les Anticorps neutralisants. Université de Strasbourg.
- 3) Amellal B, Katlama C, Calvez V. Evaluation of the use of dried spots and of different storage conditions of plasma for HIV-1 RNA quantification. *HIV Med.* 2007;8(6):396-400
- 4) Andreotti M, Pirillo M, Guidotti G, Ceffa S, Paturzo G, Germano P, Luhanga R, Chimwaza D, Mancini MG, Marazzi MC, Vella S, Palombi L, Giuliano M. Correlation between HIV-1 viral load quantification in plasma, dried blood spots, and dried plasma spots using the Roche COBAS Taqman assay. *Journal of clinical virology : the official publication of the PNAS.* 2010;47(1):4-7
- 5) Andreotti M, Pirillo M, Guidotti G, Ceffa S, Paturzo G, Germano P, Luhanga R, Chimwaza D, Mancini MG, Marazzi MC, Vella S, Palombi L, Giuliano M. Correlation between HIV-1 viral load quantification in plasma, dried blood spots, and dried plasma spots using the Roche COBAS Taqman assay. *Journal of clinical virology : the official publication of the PNAS.* 2010;47(1):4-7
- 6) Arredondo M, Garrido C, Parkin N, Zahonero N, Bertagnolio S, Soriano V, de Mendoza C. Comparison of HIV-1 RNA measurements obtained by using plasma and dried blood spots in the automated abbot real-time viral load assay. 2012;50(3):569-572. doi: 10.1128/JCM.00418-11. Epub 2011 Dec 14.
- 7) Arthur et al. Early diagenesis of marine organic matter: Alteration of the carbon isotopic composition. 1992: *Marine Geology*, v. 105, p. 51-61.
- 8) Arts EG1, et al. Fusion of artificial membranes with mammalian spermatozoa. Specific involvement of the equatorial segment after acrosome reaction. *Eur J Biochem.* 1993. 1; 217(3):1001-9.
- 9) Barré-Sinoussi F et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). 1983 May 20; 220(4599):868-71.*Serine Journal.*

- 10) Bertagnolio S, et al. 2007. HIV-1 drug resistance surveillance using dried whole blood spots. *Antivir. Ther.* 12:107–113
- 11) Birx DL1, VanCott T, Michael N, McNeil J, Stamatos N, Gilliam B, Davis R, Carr J, McCutchan F. Summary of track A: basic science. *AIDS.* 1996; 10 Suppl 3:S85-106.
- 12) Brambilla, D., C. Jennings, G. Aldrovandi, J. Bremer, A. M. Comeau, S. A. Cassol, R. Dickover, J. B. Jackson, J. Pitt, J. L. Sullivan, A. Butcher, L. Grosso, P. Reichelderfer, and S. A. Fiscus. 2003. Multicenter evaluation of use of dried blood and plasma spot specimens in quantitative assays for human immunodeficiency virus RNA: measurement, precision, and RNA stability. *J Clin Microbiol* 41:1888-1893.
- 13) Carr MC1. Urological results after fetal myelomeningocele repair in pre-MOMS trial patients at the Children's Hospital of Philadelphia. *Fetal Diagn Ther.* 2015; 37(3):211-8. doi: 10.1159/000362932.
- 14) Casás LM1, Plantier F, Bessières D. New methodology for simultaneous volumetric and calorimetric measurements: direct determination of α (p) and C (p) for liquids under pressure. *Rev Sci Instrum.* 2009 ; 80(12):124902. doi: 10.1063/1.3270258.
- 15) Cassol, S. A., M. J. Gill, R. Pilon, M. Cormier, R. F. Voigt, B. Willoughby, and J. Forbes. 1997. Quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA from dried plasma spots collected on filter paper. *J Clin Microbiol* 35:2795-801.
- 16) **Charpentier C, Gody JC, Tisserand P, Matta M, Fournier J, Mbitikon O, Belec L.** Usefulness of a genotypic resistance test using dried blood spot specimens in African HIV-infected children with virological failure according to the 2010-revised WHO criteria. *Arch Virol.* 2011;156(9):1603-1606
- 17) Ciccozzi M, Santoro MM, Giovanetti M, et al. HIV-1 non-B subtypes in Italy: a growing trend. *New Microbiologica.* 2012; 35(4):377-86.
- 18) Données mondiales sur VIH, données régionales 2015, thérapie antirétrovirale par région, ONUSIDA 2016
- 19) D'Souza V, Summers MF. How retroviruses select their genomes. *Nature Rev. Microbiol.* 2005 3:643-55. Review[PubMed]

- 20) Gamble, V.N. Under the shadow of Tuskegee: African Americans and health care. 1997. *American Journal of Public Health*, 87, 1773-1778. doi:10.2105/AJPH.87.11.1773
- 21) Ganser-Pornillos, B, Yeager, M, and Sundquist, W. 2008. The structural biology of HIV assembly. *Current opinion in structural biology* 18, 203-217.
- 22) Garrido C, et al. 2008. Subtype variability, virological response and drug resistance assessed on dried blood spots collected from HIV patients on antiretroviral therapy in Angola. *J. Antimicrob. Chemother.* 61:694–698 [PubMed]
- 23) Gjerdingen DK1, Center B.A. Randomized controlled trial testing the impact of a support/work-planning intervention on first-time parents' health, partner relationship, and work responsibilities. *Behav Med.* 2002 Fall; 28(3):84-91.
- 24) Guthrie R, Susi A. A SIMPLE PHENYLALANINE METHOD FOR DETECTING PHENYLKETONURIA IN LARGE POPULATIONS OF NEWBORN INFANTS. *Pediatrics.* 1963;32:338-343
- 25) Gwinn M, Redus MA, Granade TC, Hannon WH, George JR. HIV-1 serologic test results for one million newborn dried-blood specimens: assay performance and implications for screening. *Journal of acquired immune deficiency syndromes.* 1992;5(5):505-512
- 26) Hallack R, Doherty L, Wethers J, Parker M. 2008. Evaluation of dried blood spots specimens for HIV-1 drug resistance testing using the Trugene HIV-1 genotyping assay. *J. Clin. Virol.* 41:283–287
- 27) Hill AV1, Elvin J, Willis AC, Aidoo M, Allsopp CE, Gotch FM, Gao XM, Takiguchi M, Greenwood BM, Townsend AR, et al Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. *Nature.* 1992. 3; 360(6403):434-9.
- 28) HURAUX J. M., 2007. *Virologie. Faculté de médecine Pierre et Marie CURIE. Université Paris-VI; France.*
- 29) J Healthc Prot Manage. The use of off-duty police as additional security in an emergency department setting. 1993 summer; 9(2):104-12.

- 30) Jetzt AE1, Yu H, Klarmann GJ, Ron Y, Preston BD, Dougherty JP. High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J Virol.* 2000 ; 74(3):1234-40.
- 31) **Johannessen A, Garrido C, Zahonero N, Naman E, de Mendoza C.** HIV-1 drug resistance testing from dried blood spots collected in rural Tanzania using the ViroSeq HIV-1 Genotyping System. 2011;66(2):260-264
- 32) Kamangu NE, Kawila ME, Mukumbi H et Mvumbi LG. Estimated rates of treatment failure in first-line antiretroviral treatment in Kinschasa: Case of ACS-AMO-Congo. *IJCRIMPH.* 2012 ;4(6) :885-91
- 33) **Kane CT, Ndiaye HD, Diallo S, Ndiaye I, Wade AS, Diaw PA, Gaye-Diallo A, Mboup S.** Quantitation of HIV-1 RNA in dried blood spots by the real-time NucliSENS EasyQ HIV-1 assay in Senegal. *Journal of virological methods.* 2008;148(1-2):291-295
- 34) Kondo E, Mammano F, Cohen EA, and Gogglinger HG. The p6Gag domain of human immunodeficiency virus type 1 is sufficient for the incorporation of Vpr into heterologous viral particles. 1995. *J. Virol.*, 69 : 2759–2764.
- 35) Lubega I MM, Babirekere E, Bagenda D, Nynde L, Wabwire D, Musoke P. Long term clinical and immunological follow up of HIV infected Uganda children on highly active antiretroviral therapy. 2nd International Workshop on HIV Pediatrics Vienna, Austria ed. http://regist2.virology-education.com/abstractbook/2010_6.pdf. Page 49. p.
- 36) Masciotra S, et al. 2007. High concordance between HIV-1 drug resistance genotypes generated from plasma and dried blood spots in antiretroviral-experienced patients. *AIDS* 21:2503–2511
- 37) **Maritz J, Preiser W, van Zyl GU.** Establishing diagnostic cut-off criteria for the COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Qualitative test through validation against the Amplicor DNA test v1.5 for infant diagnosis using dried blood spots. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology.* 2012;53(2):106-109
- 38) Module 5, Traitement ARV de l'infection à VIH chez l'adulte et l'adolescent, recommandation OMS 2010

- 39) Nasioulas G1, Paraskevis D, Magiorkinis E, Theodoridou M, Hatzakis A. Molecular analysis of the full-length genome of HIV type 1 subtype I: evidence of A/G/I recombination. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1999 May 20; 15(8):745-58.
- 40) **Ndiaye O, Diop-Ndiaye H, Ouedraogo AS, Fall-Malick FZ, Sow-Sall A, Thiam M, Diouara AA, Ndour CT, Gaye-Diallo A, Mboup S, Toure-Kane C.** Comparison of four commercial viral load techniques in an area of non-B HIV-1 subtypes circulation. *Journal of virological methods*. 2015;222:122-131
- 41) Nisole S1, Saïb A. Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology*. 2004. 14; 1:9.
- 42) O'Brien, W. A, P. M. Hartigan, D. Martin, J. Esinhart, A. Hill, S. Benoit, M. Rubin, M. S. Simberkoff, J.O. Hamilton, and the Veterans Affairs Cooperative Study Group on AIOS. 1996. Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4+ lymphocyte counts and the risk of progression to AIOS. *N Engl J Med* 334:426-431.
- 43) O'Brien, W. A, P. M. Hartigan, E. S. Daar, M. S. Simberkoff, and J. D. Hamilton. 1997. Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4+ lymphocyte counts predict both response to antiretroviral therapy and therapeutic failure. *Veterans Affairs Cooperative Study Group on AIOS. Ann Intern Med* 126:939-945.
- 44) OMS 30 Septembre 2015. (<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/hiv-treat-all-recommendation/fr/>) consulté le 23 novembre 2016.
- 45) **OMS/sida, Rapport, «3X5».** largissement de l'accès au traitement antirétroviral dans le monde. Le point sur l'initiative «3millions d'ici 2005 ». 2005
- 46) **ONUSIDA-Organisation Mondiale de la sant: Rapport des données épidémiologiques.** Décembre 2012. WWW. Unaids.org
- 47) **ONUSIDA,2015.**http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/20150901_Fact_Sheet_2015_fr.pdf: 2015.
- 48) **ONUSIDA, 2013.** Guide nationale sur le diagnostic biologique de l'infection à VIH/SIDA http://www.sante.dz/jmsida2014/guide_national.pdf2013 [2 JUIN 2016].
- 49) **Ouma KN, Basavaraju SV, Okonji JA, Williamson J, Thomas TK, Mills LA, Nkengasong JN, Zeh C.** Evaluation of quantification of HIV-1 RNA viral load in

plasma and dried blood spots by use of the semiautomated Cobas Amplicor assay and the fully automated Cobas Ampliprep/TaqMan assay, version 2.0, in Kisumu, Kenya. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(4):1208-1218

- 50) **Ouma KN, Basavaraju SV, Okonji JA, Williamson J, Thomas TK, Mills LA, Nkengasong JN, Zeh C.** Evaluation of quantification of HIV-1 RNA viral load in plasma and dried blood spots by use of the semiautomated Cobas Amplicor assay and the fully automated Cobas Ampliprep/TaqMan assay, version 2.0, in Kisumu, Kenya. *Clin Microbiol*. 2013;51(4):1208-1218
- 51) Paraskevis D1, Magiorkinis E, Magiorkinis G, Kiosses VG, Lemey P, Vandamme AM, Rambaut A, Hatzakis A. Phylogenetic reconstruction of a known HIV-1 CRF04_cpx transmission network using maximum likelihood and Bayesian methods. *J Mol Evol*. 2004 Nov;59(5):709-17.
- 52) Pierre-Marie GIRARD, C. K., Gilles PIALOUX. 2004. VIH. doin ed. 840 pages.
- 53) Plantier JC, et al. 2009. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat. Med*. 15:871–872
- 54) Revillard J. P., association des enseignants d'immunologie des universités de langue française (ASSIM), 2001. *Immunologie*. Edition 4. De Boeck Université. ISBN 2804138054. 600 pp.
- 55) Robertson IH1, Nico D, Hood BM. The intention to act improves unilateral left neglect: two demonstrations. *Neuroreport*. 1995 Dec 29;7(1):246-8.
- 56) **Rottinghaus E, Bile E, Modukanele M, Maruping M, Mine M, Nkengasong J, Yang C.** Comparison of Ahlstrom grade 226, Munktell TFN, and Whatman 903 filter papers for dried blood spot specimen collection and subsequent HIV-1 load and drug resistance genotyping analysis. *Clin Microbiol*. 2013. 2013;51(1):55-60
- 57) **Rottinghaus EK, Ugbena R, Diallo K, Bassey O, Azeez A, Devos J, Zhang G, Aberle-Grasse J, Nkengasong J, Yang C.** Dried blood spot specimens are a suitable alternative sample type for HIV-1 viral load measurement and drug resistance genotyping in patients receiving first-line antiretroviral therapy. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2012;54(8):1187-1195

- 58) Rouzioux, C., D. Costagliola, et al. 1995 Estimated Timing of Mother-to-Child Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Transmission by Use of a Markov Model. Vol. 142, No. 12 Printed in U.S.A. American Journal of Epidemiology ;
- 59) **ROQUEBERT, F. DAMOND, F. BRUN-VEZINET AND D. DESCAMPS, 2009.** Diversité génétique des VIH et ses conséquences. *Pathologie Biologie*. 57 (2) : 142-148.
- 60) Santos AF, Soares MA (2010) HIV Genetic Diversity and Drug Resistance. *Viruses* 2: 503–31.
- 61) Shehu-Xhilaga M1, Kraeusslich HG, Pettit S, Swanstrom R, Lee JY, Marshall JA, Crowe SM, Mak J. Proteolytic processing of the p2/nucleocapsid cleavage site is critical for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimer maturation. 2001; 75(19):9156-64.
- 62) Siemieniuk RA, Beckthold B, Gill MJ. Increasing HIV subtype diversity and its clinical implications in a sentinel North American population. *Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*. 2013 summer; 24(2):69-73. 3.
- 63) Simon MA1, Vree TB, Gielen MJ, Booij LH, Lagerwerf AJ. Comparison of the effects and disposition kinetics of lidocaine and (+/-) prilocaine in patients undergoing axillary brachial plexus block during day case surgery. *Clin Drug Investig*. 1998; 16(3):241-50
- 64) SIMPORE J., 2006. Notes du cours de génie génétique. Maîtrise de Biochimie Microbiologie. Université d'Ouagadougou UFR- SVT
- 65) SONTIE Ba-Nébhane Sonia. intérêt du « dried blood spot » ou dbs dans le diagnostic précoce de l'infection par le vih-1 chez les enfants de moins de 18 mois nés de mère infectée : comparaison des résultats de la pcr-arn plasmatique et de la pcr-adn sur DBS. 2010. 95. Thèse n° : 95, UFR/SDS. BURKINA FASO
- 66) ONUSIDA 2014.
- 67) Swanson P, et al. 2006. Comparison to VERSANT HIV-1 RNA 3.0, AMPLICOR HIV-1 MONITOR v1.5, and LCx HIV RNA quantitative assays. *J. Virol. Methods* 137:184–192

- 68)UNAIDS. (2010). "UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2010." Retrieved April 24, 2012, from Based on the latest data from 182 countries, this global reference book provides comprehensive analysis on the AIDS epidemic and response
- 69)UNAIDS 2013 ([http:// www. unaids. org/ sites/ default/ files/ media_asset/ prevention fr 0.pdf](http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/prevention_fr_0.pdf)) consulté le 23 novembre 2016.
- 70)UNAIDS 2015
- 71)Uziel O1, Fenig E, Nordenberg J, Beery E, Reshef H, Sandbank J, Birenbaum M, Bakhanashvili M, Yerushalmi R, Luria D, Lahav M. Imatinib mesylate (Gleevec) downregulates telomerase activity and inhibits proliferation in telomerase-expressing cell lines. *Br J Cancer*. 2005. 23;92(10):1881-91.
- 72)Van Heuverswyn F1, Li Y, Neel C, Bailes E, Keele BF, Liu W, Loul S, Butel C, Liegeois F, Bienvenue Y, Ngolle EM, Sharp PM, Shaw GM, Delaporte E, Hahn BH, Peeters M. Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature*. 2006. 9; 444(7116):164. 1UMR145,
- 73)**Vidya M, Saravanan S, Rifkin S, Solomon SS, Waldrop G, Mayer KH, Solomon S, Balakrishnan P.** Dried blood spots versus plasma for the quantitation of HIV-1 RNA using a real-Time PCR, m2000rt assay. *Journal of virological methods*. 2012;181(2):177-181
- 74)Wiedmann RT1, Nonneman DJ, Keele JW. Novel porcine repetitive elements. *BMC Genomics*. 2006. 1; 7:304.
- 75)Wolfe JL1, Kawate T. Synthesis and polymerase incorporation of 5'-amino-2', 5'-dideoxy-5'-N-triphosphate nucleotides. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem*. 2004; Chapter 13: Unit 13.3. doi: 10.1002/0471142700.nc1303s18. Massachusetts General Hospital, Cambridge, Massachusetts, USA
- 76)Woodward CL, Cheng SN, Jensen GJ. Electron cryotomography studies of maturing HIV-1 particles reveal the assembly pathway of the viral core. *J Virol*. 2015;89(2):1267-1277

- 77) Xiao C1, Huang Z, Li W, Hu X, Qu W, Gao L, Liu G. High density and scale-up cultivation of recombinant CHO cell line and hybridomas with porous microcarrier Cytopore. *Cytotechnology*. 1999; 30(1-3):143-7. doi: 10.1023/A:1008038609967.
- 78) Zanon BC, Sunpath H, Feeney ME. Pediatric response to second-line antiretroviral therapy in South Africa. *PloS one*. 2012;7(11):e49591
- 79) Zoufaly A, Fillekes Q, Hammerl R, Nassimi N, Jochum J, Drexler JF, Awasom CN, Sunjoh F, Burchard GD, Burger DM, van Lunzen J, Feldt T. Prevalence and determinants of virological failure in HIV-infected children on antiretroviral therapy in rural Cameroon: a cross-sectional study. *Antiviral therapy*. 2013;18(5):681-690

REFERENCES WEBOGRAPHIQUE

- 1) (http://www.ansd.sn/publications_SES.html) consulté en avril 2013
- 2) (<http://cdfsvt.free.fr/dossiers/svt0207b.pdf>) consulté le 20 Avril 2016
- 3) (<http://faculty.ccbcmd.edu/>) consulté le 20 Avril 2016
- 4) (http://georges.dolisi.free.fr/Physiopathologie/sida_infection.htm) consulté 3 juin 2016
- 5) www.womenchildrenhiv.org.
- 6) (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/fr/>) consulté le 23 novembre 2016.
- 7) <https://sites.google.com/site/tpemathematiquesetvih/home/presentation-du-vih/presentation/generalites-vih>) consulté 3 juin 2016
- 8) (<http://www.cegidd.fr/VIH-SIDA.htm>) consulté 17 janvier 2016
- 9) (<http://www.sante.dz/jmsida2014/guidenational.pdf> 2013) consulté 15 juillet 2016.
- 10) <http://www.cegidd.fr/VIH-SIDA.htm>) consulté 17 janvier 2016
- 11) (<http://www.au-senegal.com/les-regions-du-senegal,3605.html>) consulté 17 janvier 2016
- 12) (<http://www.bdbiosciences.com/sg/instruments/facscount/index.jsp>) consulté le 23 novembre 2016

TABLE DES MATIERES

DEDICACES	II
REMERCIEMENTS	III
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	VI
LISTE DES FIGURES	X
TABLEAUX	XI
SOMMAIRE	XII
INTRODUCTION	1
PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	3
CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉS	4
I. STRUCTURE DES VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE	4
I.1. Morphologie	4
I.2. Organisation génomique du VIH	5
II. CYCLE DE RÉPLICATION DU VIH	8
II.1. Une phase précoce du cycle viral	8
II.2. Une phase tardive cycle viral	10
III. DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DU VIH	13
III.1. Origine de la variabilité génétique	13
III.2. Les différents groupes, sous types et formes recombinants	14
IV. EPIDEMIOLOGIE	17
V. MODES DE TRANSMISSION DU VIH	18
V.1. La transmission par voie sexuelle	18
V.2. Transmission par voie sanguine	18
V.3. Transmission verticale	18
VI. ETHIOPATHOLOGIE.....	18
VI.1. La phase de primo-infection	19
VI.2. Phase de latence ou d'infection chronique	20
VI.3. La phase clinique	20
CHAPITRE II. LE DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE ET MONITORING BIOLOGIQUE DU VIH	21
I. LES DIFFERENTS TECHNIQUES DE QUANTIFICATION DU VIH-1	21
I.1- Les techniques de diagnostic de l'infection à VIH/SIDA	21
I.2- Les techniques de suivi virologique	21
II. TRAITEMENT	24

II.1. Le choix thérapeutique (OMS, 2015)	26
CHAPITRE III : UTILITE DU PAPIER BUVARD DANS LE MONITORING VIROLOGIQUE	28
I. Propriétés du papier buvard.....	28
II. Les avantages du papier buvard	29
PARTIE II : TRAVAIL EXPERIMENTAL	30
CHAPITRE I : METHODOLOGIE	31
1. CONTEXTE.....	31
1.1. Informations générales sur le Sénégal.....	31
1.2. Présentation du cadre d'étude	31
1.3. Type etude et Échantillonnage.....	32
CHAPITRE II : MATERIELS/METHODES	32
1. MATÉRIELS/RÉACTIFS.....	32
1.1. Matériels	32
1.2. Réactifs et solutions.....	35
2. METHODES	36
2.1. Prélèvement	36
2.2. Numération CD4/CD8 :	36
2.2.1. Préparation des échantillons	36
2.3. Confection des DBS (figure 12) et Plasmas:	37
2.4. Acheminement et conservation	37
2.5. Charge virale par la technologie Abbott RealTime HIV-1 ® (m2000sp/rt) ...	37
CHAPITRE III : RESULTATS/DISCUSSION	40
1. RÉSULTATS	40
1.1. Caractéristiques de l'échantillonnage	40
1.2. Résultats de CD4 :.....	40
1.3. Résultats de charge virale plasmatique :	41
1.4. Résultats de charge virale sur DBS	42
1.5. La comparaison des valeurs de CV des deux techniques DBS Vs plasma.....	43
❖ Corrélation et concordance des charges virales plasmatiques et DBS.....	44
2. DISCUSSION	47
CONCLUSION.....	49
LES RECOMMANDATIONS	50
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	51
REFERENCES WEBOGRAPHIQUE	59
TABLE DES MATIERES	61
RÉSUMÉ.....	64

MODE D'UTILISATION DE BD FAScount	66
❖ Analyse des échantillons (figure 13)	66
❖ Entretien journalier de la machine	66

RÉSUMÉ

Problématique : Le VIH constitue un véritable fléau de santé publique. La mesure de l'ARN VIH-1 plasmatique nécessaire au suivi biologique des patient sous ARV et au diagnostic précoce des enfants exposés au VIH, nécessite un équipement coûteux, un personnel qualifié et des conditions particulières de prélèvement. La technique de prélèvement sur papiers filtre (DBS) pour réaliser la mesure de la CV de l'ARN VIH-1 à partir de sang total constitue une alternative intéressante pour toutes les plateformes commerciales.

Objectif : L'objectif de l'étude était d'évaluer la charge virale VIH-1 sur DBS par rapport aux prélèvements sur tube EDTA en utilisant la plateforme m2000 d'Abbott.

Méthode : Une étude prospective comparative utilisant DBS et plasma a été entreprise. A partir des prélèvements des sangs totaux recueillis sur des tubes EDTA, les DBS et les plasmas ont été respectivement confectionnés et recueillis, conservés à -80°C au niveau de Laboratoire de CHU FANN. Puis transportés vers CHU Le Dantec pour déterminer la CV. Les mesures des charges virales ARN VIH-1 ont été réalisées sur le plasma et les DBS pour chaque patient avec plateforme m2000 d'Abbott. L'extraction de l'ARN VIH-1 a été réalisée par l'automate m2000sp et l'amplification avec l'automate m2000rt, outil d'amplification/détection en temps réel.

Résultats :

La comparaison des valeurs de charge virale obtenues entre DBS et plasma été faite sur la base de leur différence de log. Seuls 14 échantillons avaient présenté une discordance avec une différence de log $\geq \pm 0,5$. Ces 14 échantillons discordants ont été confirmé par le graphe de Bland-Altman en se positionnant en dehors de la limite de confiance avec un biais très faible de **-0.589 [- 0,832 à - 0.347]** et un coefficient de corrélation R= 0,92.

Conclusion : Au regard de nos résultats l'utilisation des DBS trouve sa place dans notre contexte de pays à ressources limités, aussi bien pour le diagnostic que pour le suivi des personnes infectées.

Cette étude a montré que le DBS est un bon outil alternatif en zone décentralisée pour la détermination de la CV HIV-1.

ANNEXE

MODE D'UTILISATION DE BD FAScount

❖ Analyse des échantillons (figure 13)

- 1- Appuyer sur la touche [SAMPLE] indiquée sur l'écran
- 2- Entrer si cela n'a pas été fait ou vérifier si ça était fait le code du lot et celui des beads inscrits sur le kit réactif ; Puis appuyer sur [CONFIRM]
- 3- Entrer le numéro d'identification de l'échantillon
- 4- Vortexer la paire de réactif de l'échantillon debout pendant 5 secondes
- 5- Enlever le bouchon sur le tube CD4 et placer le sur le levier de lecture
- 6- Appuyer [RUN]
- 7- Retirer la paire de tubes, refermer le tube CD4
- 8- Enlever le bouchon sur le tube CD8-Low, placer le sur le levier de lecture et appuyer [RUN]
- 9- Laisser la machine imprimer les résultats

❖ Entretien journalier de la machine

- 1- Appuyer [UTILITY] sur l'écran de la machine
- 2- Appuyer ensuite [CLEAN]
- 3- Placer le tube marqué **solution de lavage** sur le levier de lecture et appuyer [RUN]
- 4- Retirer le et placer ensuite le tube marqué **solution de rinçage** sur le levier de lecture et appuyer [RUN]
- 5- À la fin de la manipulation, appuyer sur [UTILITY] sur l'écran de la machine, puis sur [SHUT DOWN]
- 6- Placer le tube marqué **eau distillée** sur le levier de lecture et appuyer [RUN]
- 7- Eteindre la machine