

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure du VIH http://commons.wikimedia.org/wiki/File:HIV_Virion-fr.svg	6
Figure 2 : Schéma du génome VIH-1 ⁽⁸⁴⁾	9
Figure 3 : Schéma de la fixation (3a) et de l'entrée du VIH (3b)	14
Figure 4 : Schéma de la transcription inverse	15
Figure 5 : Schéma de l'intégration	15
Figure 6 : Schéma de la transcription (6a) et de la traduction (6b) du génome viral	16
Figure 7 : Assemblage et bourgeonnement des nouveaux virions ⁽¹¹³⁾	16
Figure 8 : Evolution des marqueurs biologiques au cours de l'infection. ⁽⁸¹⁾	19
Figure 9 : Evolution des sites de PEC ⁽⁴⁾	34
Figure 10 : Evolution du niveau de décentralisation de patients sous ARV ⁽⁴⁾	34
Figure 11 : Taux de couverture de mise sous ARV des PVVIH ⁽⁴⁾	35
Figure 12 : Photographies des cartes de DBS avec les différents volumes déposés	45
Figure 13 : Photographie d'un sac zippé prêt pour la conservation ou pour l'envoi	46
Figure 14 : Photographie des tubes de lyse sur l'agitateur horizontal	47
Figure 15 : Schéma de l'extraction sur Nuclisens EasyMAG	48
Figure 16 : Principe de la réaction d'amplification par NASBA	50
Figure 17 : Principe de la détection par les balises moléculaires	51
Figure 18 : Droite Régression et Bland-Altman Plasma <i>vs</i> DBS_50	56
Figure 19 : Droite de régression et Bland-Altman Plasma <i>vs</i> DBS_75	57
Figure 20 : Droite de régression et Bland-Altman Plasma <i>vs</i> DBS_100	57
Figure 21 : Droite de régression et Bland-Altman Plasma <i>vs</i> DBS_150	58
Figure 22 : Droite de régression et Bland-Altman DBS_50 <i>vs</i> DBS_75	60
Figure 23 : Droite de régression et Bland-Altman DBS_50 <i>vs</i> DBS_100	60
Figure 24 : Droite de régression et Bland-Altman DBS_50 <i>vs</i> DBS_150	61
Figure 25 : Droite de régression et Bland-Altman DBS_75 <i>vs</i> DBS_100	62
Figure 26 : Droite de régression DBS_50 <i>vs</i> DBS_150	62
Figure 27 : Droite de régression et Bland-Altman DBS_100 <i>vs</i> DBS_150	63

INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : GENERALITES SUR L'INFECTION A VIH/SIDA	
Chapitre I : L'infection à VIH/SIDA	4
1. HISTORIQUE DE L'INFECTION A VIH/SIDA	4
2. BIOLOGIE ET TAXONOMIE DU VIH-1	5
2.1. Définition et classification du VIH-1	5
2.2. Morphologie et structure du VIH-1.....	5
2.3. Organisation génomique du VIH-1	8
2.3.1. Les gènes de structure	9
2.3.2. Les gènes de régulation et les gènes accessoires	11
2.3.3. Les LTR	12
2.4. La variabilité génétique du VIH-1	13
2.5. Le cycle répliquatif du VIH-1	14
2.6. Le tropisme du VIH-1	17
3. Physiopathologie de l'infection à l'infection à VIH-1.....	17
3.1. La phase de primo-infection	18
3.2. La phase de latence clinique	18
3.3. La phase symptomatique aboutissant au SIDA.....	19
4. Modes de transmission	20
4.1. Transmission horizontale	20
4.1.1. Par voie sexuelle	20
4.1.2. Par voie sanguine	21
4.2. Transmission verticale	22
5. Epidémiologie	24
5.1. Aperçu mondial.....	24
5.2. En Afrique Subsaharienne	24
5.3. Au Sénégal	25
6. Diagnostic biologique.....	26

6.1.	Diagnostic indirect	26
6.1.1.	Tests de dépistage	26
6.1.2.	Tests de confirmation.....	26
6.2.	Diagnostic direct	27
6.2.1.	Détection de l'Ag P24.....	27
6.2.2.	Isolement du VIH par culture cellulaire.....	27
6.2.3.	Détection des acides nucléiques viraux.....	28
Chapitre II : Traitement de l'infection à VIH.....	30	
1.	Les molécules antirétrovirales	30
1.1.	Les inhibiteurs nucléosidiques de la reverse transcriptase.....	30
1.2.	Les inhibiteurs non nucléosidiques de la reverse transcriptase.....	30
1.3.	Les inhibiteurs de protéases (IP)	31
1.4.	Les inhibiteurs de fusions et d'entrée (IF et IE).....	31
1.5.	Les inhibiteurs de l'intégrase (IIN)	31
2.	Le traitement	31
3.	Prise en Charge des PVVIH au Sénégal.....	32
3.1.	Présentation de l'ISAARV	32
3.1.1.	Historique.....	32
3.1.2.	Réalisations jusqu'à ce jour	33
3.2.	Prise en charge des PVVIH.....	35
3.3.	Utilisation du papier buvard comme support de prélèvement	36
DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL		
Chapitre I : Contexte, Justificatifs et Objectifs de l'Etude		36
1.	Contexte et Justificatifs de l'étude.....	37
2.	Objectifs de l'Etude	2
2.1.	Objectif général.....	2
2.2.	Objectifs spécifiques	2
Chapitre II : Matériel et Méthodes.....		40
1.	Type d'étude	40

2.	Cadre de l'étude	40
3.	Echantillonnage.....	43
4.	Matériel.....	43
4.1.	Matériel d'usage général.....	43
4.2.	Réactifs et équipements pour la technologie Nuclisens EasyQ HIV-1 V 2.0	44
4.2.1.	Extraction.....	44
4.2.2.	Amplification et détection.....	44
5.	Méthodologie de l'étude	45
5.1.	Vérification de l'identification et attribution d'un numéro	45
5.2.	Préparation des spots et conservation	45
5.3	Séparation lymphocytaire et conservation	46
5.4	Découpe des DBS et lyse	46
5.5.	Extraction – Amplification et détection par la technologie Nuclisens EasyQ HIV-1 V2.0.....	48
5.5.1.	Extraction des acides nucléiques sur l'automate EasyMAG.....	48
5.5.2.	Amplification et détection par la technologie Nuclisens EasyQ HIV-1 V2.0.....	49
6.	Analyse statistique des résultats	52

TROISIEME PARTIE : EXPLOITATION DES RESULTATS

Chapitre I : Résultats.....	54	
1.	Résultats de la charge virale plasmatique	54
2.	Comparaison globale des valeurs de CVP avec les DBS	54
3.	Analyse des discordances plasma DBS vs en fonction des valeurs de CVP	55
4.	Droite de régression linéaire et concordance plasma vs DBS	56
4.1.	Régression linéaire et concordance Plasma vs DBS_50	56
4.2.	Régression linéaire et concordance Plasma vs DBS_75	56
4.3.	Régression linéaire et concordance Plasma vs DBS_100	57
4.4.	Régression linéaire et concordance Plasma vs DBS_150	58
5.	Comparaison des valeurs de charge virale obtenues sur DBS.....	58
6.	Analyse des discordances DBS vs DBS en fonction des valeurs de CVP	59
7.	Droite de régression linéaire et concordance entre les prélèvements DBS.....	59

7.1.	Régression linéaire et concordance DBS_50 vs DBS_75	59
7.2.	Régression linéaire et concordance DBS_50 vs DBS_100	60
7.3	Droite de régression linéaire et concordance DBS_50 vs DBS_150	61
7.4.	Régression linéaire et concordance DBS 75 vs DBS 100	61
7.5.	Droite de régression linéaire DBS 75 vs DBS 150	62
7.6.	Ligne de régression linéaire DBS_100 vs DBS_150	63

Discussion

1.	Utilisation du papier buvard et de la technologie NucliSENS	64
2.	La méthodologie	66
3.	Les résultats	66
3.1.	Plasma <i>vs</i> DBS	66
3.2.	DBS <i>vs</i> DBS	67

CONCLUSION

Références bibliographiques	71
--	-----------

Annexe 1

INTRODUCTION

Plus de trente ans après sa découverte, malgré les progrès considérables enregistrés, le virus de l'immunodéficience humaine responsable de la pandémie du Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquise (SIDA), constitue la 3^{ème} cause de mortalité dans les pays à faibles revenus. Ce fléau demeure un challenge pour la communauté scientifique, malgré les campagnes de prévention et de sensibilisation menées jusque-là. L'ONUSIDA en 2012, estime à 34,2 millions le nombre de personnes vivant avec le VIH/SIDA dans le monde avec 2,8 millions de nouvelles infections et environ 1,7 millions de décès liés au VIH/SIDA.

L'Afrique subsaharienne demeure la région du monde la plus touchée avec 23,5 millions de personnes vivant avec le SIDA dont 3,1 millions d'enfants. Toutefois des efforts considérables ont été notés en particulier dans l'accès au traitement dans les pays à revenus faibles et intermédiaires, de l'ordre de 6,6 millions de personnes, soit près de la moitié de ceux éligibles.⁽³⁾

Les premiers cas de la maladie ont été décrits en 1981 aux Etats Unis.⁽¹⁾ De nombreuses recherches ont permis d'isoler en 1983 le VIH-1 comme agent responsable de la pandémie.⁽¹⁰⁾ Un second virus apparenté au premier mais génétiquement distinct, a été décrit pour la première fois en 1985⁽⁸⁾ puis isolé en 1986 à partir de PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) de patients Cap-verdiens et Bissau Guinéens.⁽²⁷⁾ Dénommé VIH de type 2 (VIH-2), ce virus est endémique en Afrique Occidentale, qui en est l'épicentre de ce nouveau virus. Le VIH-2 présente de nombreuses similitudes avec le VIH-1 telles que l'arrangement des gènes de base, les modes de transmission, les voies de réPLICATION intracellulaire et les conséquences cliniques. Toutefois, le VIH-2 est caractérisée par une transmissibilité faible et une évolution vers le SIDA comparée au VIH-1.⁽⁸⁶⁾

Le VIH-1 est divisé en 4 groupes M, N, O et P. Le groupe M, dont la plupart des souches sont impliquées dans la pandémie actuelle, est constitué de 9 sous types : A, B, C, D, F, G, H, J et K.⁽⁹²⁾ Le groupe P de découverte récente, n'a été identifié qu'en 2009, et il n'a montré aucun signe de recombinaison avec les autres groupes de VIH-1.⁽⁹⁴⁾

Au sein du groupe M, il existe des variants résultant des combinaisons inter sous types : ce sont les *Circulating Recombinant Forms* (CRFs), qui sont au nombre de 55¹ ou des formes recombinantes uniques (URFs).^(70, 98) Certains de CRFs recombinants occupent une place importante dans l'épidémie : c'est le cas du recombinant CRF02_AG, qui résulte d'une

¹ <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html> (Consulté le 19.07.13)

recombinaison entre les sous-types A et G ; ce recombinant est le variant prédominant en Afrique de l'Ouest en général et au Sénégal en particulier. ^(80, 117)

La gravité de l'infection à VIH/SIDA est liée au fait que le virus cible principalement et entraîne la destruction des cellules du système immunitaire portant la molécule CD4+ en particulier les lymphocytes TCD4, les monocytes et les macrophages. De ce fait, la mesure du taux de CD4 constitue l'un des marqueurs essentiels du suivi biologique. Mais l'élément essentiel dans la pathogénèse du VIH est le niveau massif de la production virale (dizaines de milliards de particules virales libérées chaque jour chez le sujet infecté non traité) qui est responsable de la destruction des cellules immunitaires. ⁽¹⁰³⁾

C'est dans le but de contrôler cette réPLICATION intensive du virus et de freiner la destruction massive des lymphocytes T CD4 que les sujets ayant un déficit immunitaire important sont mis sous un traitement antirétroviral (TARV) hautement actif associant au moins 3 molécules. Cependant, ce traitement doit faire l'objet d'un suivi afin d'évaluer l'état d'immunodépression du malade mais aussi d'apprécier la réponse au traitement.

Le niveau de la réPLICATION virale est mesuré par la détermination de la charge virale qui est également un marqueur indispensable dans le monitoring du TARV. Les premiers tests commerciaux ont vu le jour en 1996. Depuis, ils ont beaucoup évolués et ont été considérablement améliorés pour tenir compte de la variabilité du VIH-1 ⁽¹²⁴⁾ ; leur seuil de détection est de 10 à 50 copies/ml. ⁽³⁷⁾

Dans les pays à ressources limitées, les obstacles majeurs de la réalisation du suivi des patients sous TARV restent le coût (50 à 100 USD par test), le nombre limité d'infrastructures adéquates, et la logistique (difficultés liées au transport et à la conservation des prélèvements sur tube).

Tous ces obstacles, posant un réel problème pour le suivi virologique des personnes vivant avec le VIH (PVVIH) en zone décentralisée, ont favorisé la promotion de l'utilisation du papier buvard ou DBS (**Dried Blood Spot**) comme support alternatif de prélèvements sanguins.

(60) Le recours au papier buvard pour l'analyse des prélèvements sanguins remonte à 1960 avec le test de Guthrie⁽⁵⁰⁾; il permet le recueil du sang et la conservation sous forme desséché sans détérioration des acides nucléiques. Ainsi les DBS peuvent être aisément réalisés et envoyer au laboratoire après respect des conditions de sécurité et d'hygiène. De nombreuses études ont également rapportées l'usage des DBS comme technique performante pour le suivi virologique (charge virale et génotypage de résistance) des PVVIH en zone décentralisée et recevant un TARV afin de prévenir le développement de la résistance aux ARV.^{(57, 60) (100, 101)}

Au Sénégal comme dans la plupart des pays en Afrique, il existe à ce jour un nombre limité de laboratoires capables de réaliser ce suivi virologique,⁽⁶⁰⁾ tous localisés au niveau de la capitale. Pour tous les patients vivant en dehors de Dakar, la charge virale est réalisée depuis 2008 sur DBS en utilisant la technologie Nuclisens EasyQ HIV-1 Version 2.0 des laboratoires Biomérieux.⁽⁶⁰⁾

La plupart études de charge virale sur DBS ont rapportées la validité de l'utilisation de 2 spots de 50µl de DBS (de 12mm de diamètre) pour la quantification de la charge virale ; et c'est dans ce contexte, que nous nous sommes proposés d'évaluer l'impact du volume de sang déposé sur le papier buvard, sur la valeur de la charge virale mesurée.

Pour atteindre cet objectif, nous avons comparé les résultats de charge virale de 2 spots de 50µl, 75µl, 100µl et 150µl de sang déposés sur papier buvard à un volume de 100µl de plasma.

Ce sont les résultats de cette évaluation qui sont présentés dans ce travail que nous aborderons comme suit :

- Une première partie avec les chapitres :
 - ✓ Généralités sur l'infection à VIH/SIDA, sa physiopathologie et son diagnostic biologique.
 - ✓ Prise en charge des PVVIH au Sénégal.
- Une deuxième partie avec les chapitres :
 - ✓ Contexte, Justificatif et Objectifs de l'étude.
 - ✓ Matériel et Méthodes.
- Une troisième partie où les résultats obtenus seront analysés, commentés et discutés avec la revue de la littérature.
- Une conclusion avec des recommandations et des perspectives qui en découlent.

PREMIERE PARTIE :

GENERALITES SUR

L'INFECTION A

VIH/SIDA

Chapitre I : L'infection à VIH/SIDA

1. HISTORIQUE DE L'INFECTION A VIH/SIDA

En 1981, des chercheurs du CDC (Center for Disease Control ; USA) d'Atlanta dans le *Mortality and Morbidity Weekly Report*, décrivaient l'apparition chez des jeunes homosexuels masculins d'une infection rare, présentant un tableau clinique inhabituel. A cette même époque, les pneumonies à *Pneumocystis jiroveci* anciennement *carinii*⁽¹⁾ puis les sarcomes de Kaposi observés chez les malades⁽²⁾ étaient corrélés à un déficit immunitaire profond ; déjà reconnu comme étant lié à une disparition d'une population des cellules de l'immunité : les lymphocytes T CD4. Ces observations orientèrent la recherche de l'agent responsable vers celle d'un virus dont le refuge serait les cellules immunes des organes lymphoïdes.

Le Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise (SIDA) a été rapidement considéré comme une maladie virale transmissible par voie sexuelle, par voie sanguine et plus tard par le lait maternel.^(9, 65, 115)

C'est ainsi qu'en 1983, l'équipe du Professeur MONTAGNIER^(10, 24) de l'institut Pasteur de Paris isola pour la première fois des cellules lymphoïdes ganglionnaires d'un patient atteint de lymphoadénopathie généralisée persistante, un rétrovirus humain encore inconnu à l'époque. Ce virus fut dénommé quelques années plus tard, Virus de l'Immunodéficience Humaine.

Dès 1985, la notion de variabilité génétique du VIH a été évoquée par la découverte chez les patientes travailleuses du sexe, originaires d'Afrique de l'Ouest, d'un second virus apparenté au premier mais génétiquement distinct.^(8, 28) Ces virus de la même famille, considérés comme agents responsables du SIDA, furent dénommés après une harmonisation taxonomique, VIH-1 et VIH-2.

En 1985, l'utilisation de peptides liés au même support en polystyrène comme dans la synthèse des peptides a permis la mise en place d'un système de test hautement spécifique et sensible, sans risque de réaction croisée non spécifique en raison d'une contamination par des matières de protéine bactérienne ou cellulaire.⁽⁷⁸⁾ Depuis le début des années 90, différentes techniques ont permis de réaliser des tests de dépistage à résultat rapide. Au milieu des années 2000, des tests rapides, utilisant les techniques d'immunofiltration ou d'immuno-

chromatographie à la recherche d'anticorps anti-VIH ont vu le jour et permettent d'obtenir un résultat dans un délai inférieur à 30 minutes grâce à un kit de réactifs sans avoir besoin d'avoir recours aux équipements sophistiqués d'un laboratoire. Ils peuvent être réalisés sur différents fluides biologiques dont le sérum, le sang total ou la salive.

En 1996, les premiers tests commerciaux pour la détermination de la charge virale de l'infection à VIH-1 ont été disponibles⁽⁷²⁾ ainsi que les premières trithérapies. Les résultats après leur mise en place ont été encourageants.

2. BIOLOGIE ET TAXONOMIE DU VIH-1

2.1. Définition et classification du VIH-1

Le VIH-1 est un *Lentivirus* appartenant à la famille des *Retroviridae* et à la sous-famille des *Lentivirinae*.

Les *Retroviridae* (ou Rétrovirus) constituent une famille de virus à ARN caractérisés par la présence d'une enzyme structurale, la transcriptase inverse ou reverse transcriptase (RT) capable de synthétiser, à partir de l'ARN viral, un ADN bicaténaire qui va s'intégrer dans le génome de la cellule hôte.

Les Rétrovirus étaient subdivisés en 7 genres regroupés dans 3 sous-familles selon l'ancienne classification. La nouvelle classification basée sur leur pathogénicité et leur morphologie ne considère plus que 2 familles : celle des *Orthovirinae* regroupant les 6 premiers genres y compris les Lentivirus et celle des *Spumavirinae*.⁽¹⁶⁾

Les Rétrovirus sont capables d'infecter toutes les espèces animales, notamment les vertébrés parmi lesquels : les bovins, les caprins, les équidés, les chats et les primates. Le VIH-1 est classé dans le « sous-genre » des *Lentivirus* des Primates à l'instar des virus de l'immunodéficience simienne ou SIV (Simian Immunodeficiency Virus).

2.2. Morphologie et structure du VIH-1

Le VIH-1 se présente schématiquement en microscopie électronique sous forme de particule sphérique de 90 à 120 nm de diamètre comme le montre la figure 1.

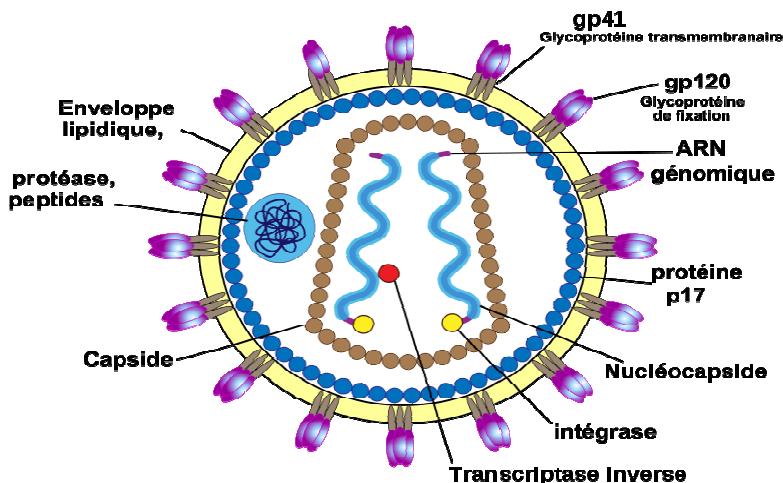


Figure 1 : Structure du VIH http://commons.wikimedia.org/wiki/File:HIV_Virion-fr.svg

La particule virale comprend de l'extérieur vers l'intérieur :

- **Une enveloppe** constituée d'une bicouche lipidique qui provient de la membrane plasmique de la cellule hôte, acquise par le virus lors de sa sortie par bourgeonnement. Cette membrane porte 2 types de glycoprotéines, la gp 120 et la gp 41. La glycoprotéine 120 (gp120) est une partie importante des pointes de l'enveloppe qui ornent la surface du VIH-1 et une des principales cibles des anticorps neutralisants. Cette glycoprotéine de surface (**gp120**) est attachée de façon non covalente à la glycoprotéine transmembranaire **gp41**. Les protéines d'enveloppe gp120 et gp41 jouent un rôle crucial de récepteur dans la liaison et la fusion membranaire du virus avec lymphocytes CD4 +. Le fragment 254-274 de la gp120 est conservé dans toutes les souches de VIH, et faisant partie de la protéine gp120, il se comporte d'une part comme un « immuno silencieux » et d'autre part comme un « immuno réactif ». Lorsque ce fragment se lie à son récepteur, il active le domaine de fusion de la gp41 qui permet la pénétration du virus dans les cellules CD4 + des cellules-hôtes. ⁽⁶¹⁾
- **Une matrice** constituée par la protéine **p17**, est retrouvée sous la bicouche lipidique. La protéine **17 MA** est liée à la surface interne de l'enveloppe par l'intermédiaire d'un acide myristique et stabilise la structure. La protéine p17 du VIH-1 est une principale protéine de structure impliquée dans les différentes étapes du cycle de vie du rétrovirus. Elle participe aux premières étapes de la réPLICATION du virus et dans l'enveloppement des virions néoformés et l'assemblage des particules. Outre ses fonctions bien établies, la p17 agit comme une cytokine virale qui

fonctionne sous forme pro active. Les cellules T humaines favorisent la production et la libération des cytokines pro-inflammatoires et la réPLICATION du VIH-1 après liaison à un récepteur cellulaire (p17R). Ainsi, la p17 pourrait jouer un rôle clé dans le réseau complexe de facteurs de stimulation hôte et dérivés de virus qui contribuent à créer un environnement favorable pour l'infection et la réPLICATION.⁽⁴⁰⁾

La p17 a une capacité d'induire une activation et une inflammation des monocytes ; il a été démontré que le CXCR1 est un récepteur moléculaire responsable de l'activité des chimiokines de la p17 sur les monocytes.⁽⁴⁴⁾

La protéine p17 agit en aval de la protéine kinase C et inhibe la kinase du facteur neurotrophique B-brain-derived de la voie du récepteur tyrosine (TrkB-BDNF). Il empêche les facteurs de survie et augmente l'expression de la protéine précurseur de l'amyloïde suggérant ainsi son implication dans les voies Abeta pro-apoptotiques présentes dans la maladie d'Alzheimer.⁽⁸³⁾

- **Une capsidE** située au centre du virus, de structure conique protège l'ARN viral et est constituée de la protéine p24. Elle possèDE 2 régions fonctionnelles essentielles : la région majeure d'homologie (MHR) et la région N-terminale (Amino-terminale). La région majeure d'homologie en position centrale de la protéine, intervient avec la région Carboxy-terminale (C-terminale), dans la formation des oligomères p24 CA conduisant à l'assemblage de la particule virale. La région N-terminale intervient dans la morphogénèSE de la capsidE.⁽¹⁰⁵⁾
- **Une nucléocapsidE** constituée principalement par une protéine basique p7. La p7 possèDE 2 motifs en doigts de zinc, le premier permettant l'emballage de l'ARN par interaction avec les acides nucléiques ; le second est requis pour la stabilité des particules virales.

Le rôle de la nucléocapsidE (NC) dans les étapes précoces de la réPLICATION rétrovirale semble être celui d'un facilitateur pour l'intégration et la transcription inverse. L'un des principaux rôLES du NC est d'améliorer l'efficacité de l'infection précoce, augmentant ainsi la probabilité de réPLICATION productive et, finalement, de la survie des rétrovirus.⁽¹¹⁶⁾

NCp7 est une protéine qui a un rôle de chaperonne mais aussi un important rôle dans la dimérisation de l'ARN et son encapsidation. La présence et le type du doigt Zn est important pour l'activité chaperon du NCp7 mais pas l'ordre des doigts Zn.

La protéine p6 : elle joue un rôle dans l'incorporation de VPR (Viral Protein R) lors de l'assemblage de particules virales indique que p6 module les interactions membranaires du gène *gag* du VIH-1. Il régule l'étape finale de la libération des virions naissants de la membrane cellulaire une action tardive. Il a été montré que la p6 module les interactions membranaires du gène *gag* du VIH-1.⁽¹⁰⁹⁾

- **Un génome viral** représenté par 2 brins d'ARN monocaténaires de polarité positive.
- **Des enzymes virales** à savoir, **la reverse transcriptase (RT), l'intégrase (IN) et la Protéase (PR).**

Outre les protéines virales, on retrouve aussi dans la particule virale des molécules d'origine cellulaire.

2.3. Organisation génomique du VIH-1

Le génome du VIH-1 est caractérisé par une grande variabilité et un polymorphisme d'une souche à une autre ; cependant la structure génétique est toujours similaire et, de l'extrémité 5' – P vers l'extrémité 3'- OH, on retrouve l'organisation suivante : LTR-gag-pol-vif-vpr-vpu-env-tat-rev-nef- LTR.

Les LTR (Long Terminal Repeat) sont des séquences non codantes contenant de nombreux sites potentiels de liaisons avec des protéines cellulaires.

Neuf cadres de lectures ouverts (ORFs, Open reading frames) sont présents, chacun correspondant à un gène. Certains de ces gènes codent pour plusieurs protéines via un précurseur : ce sont les gènes de structure *gag*, *pol* et *env*. D'autres gènes sont présents sur le génome : ce sont les gènes régulateurs (tat et rev) et les gènes accessoires (*vif*-*vpr*-*vpu* et *nef*). Deux protéines sont codées en exons : Tat et Rev (protéines régulatrices).

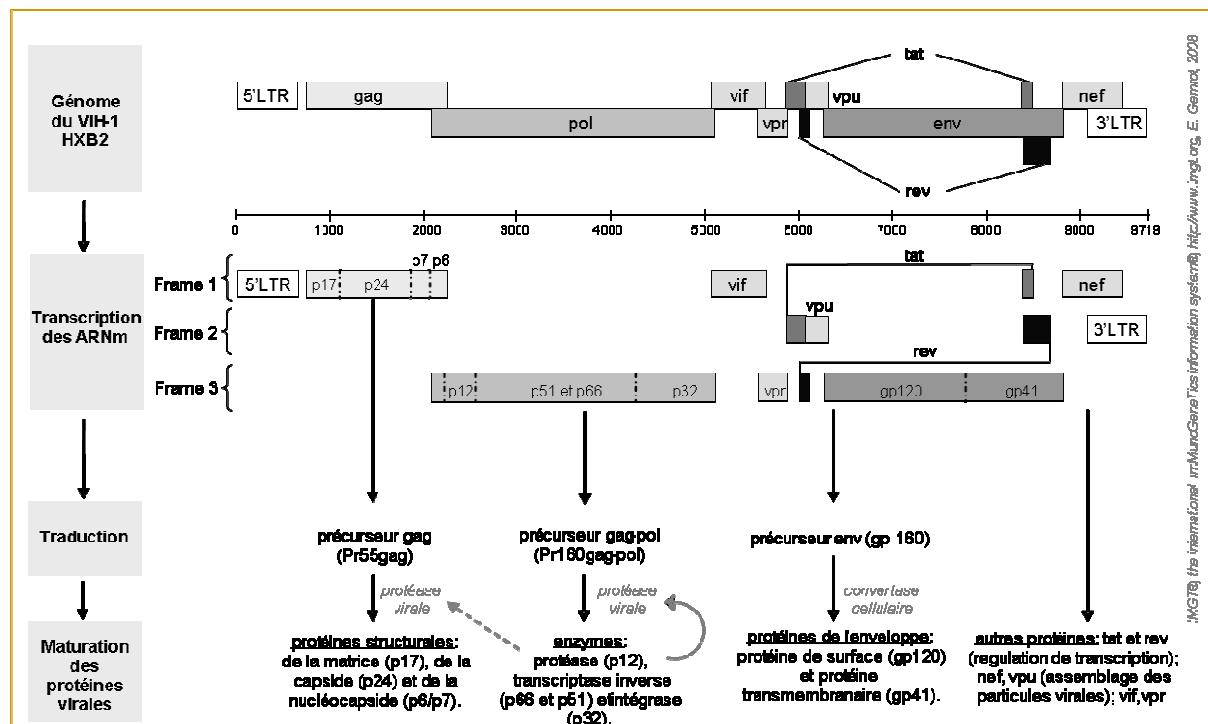


Figure 2 : Schéma du génome VIH-1⁽⁸⁴⁾

2.3.1. Les gènes de structure

Le gène **gag** (gènes des antigènes de groupe) : c'est le premier cadre de lecture ouvert sur le génome VIH. Il a une longueur d'environ 1500 Pb (paires de bases) et code pour la poly protéine Pr 55gag qui, après clivage par la protéase, donne de l'extrémité N-terminale vers C-terminale, les protéines structurales du virion mature : p17MA, p24CA, p7NC, p6 et 2 petits peptides p1gag et p2gag. Une mutation introduite dans le gène **gag** (dans la partie codant pour la protéine p24) entraîne l'incapacité du virus muté à se répliquer.

Le domaine MA (matrice) de la poly protéine gag joue plusieurs rôles importants au cours de l'assemblage du virus. La poly protéine gag est connue pour cibler le feuillet interne de la membrane plasmique pour le bourgeonnement du virus, mais des études récentes ont révélé que MA contribue également à l'emballage sélective de l'ARN génomique (ARNg) dans les virions.⁽⁹⁰⁾

Le ciblage et la reliure de Gag à la membrane plasmique sont les premières étapes de ce processus d'assemblage et sont médiés par le domaine de la matrice de Gag.⁽²⁶⁾

Le gène **pol** (pour polymerase) : c'est le gène le plus conservé du génome, avec une longueur d'environ 3000 Pb, codé sous forme de poly protéine Pr160gagpol. A son extrémité

existe un petit gène qui code pour une protéase dont le rôle est de cliver les protéines produites par le gène ***gag***. Le gène ***pol*** code pour les 3 enzymes virales :

- **La transcriptase inverse TI** : c'est une ADN polymérase ADN/ARN dépendante qui est l'une des enzymes les plus importantes. Elle est responsable de la transformation de l'ARN simple brin en ADN proviral simple brin, puis de la formation de l'ADN complémentaire qui va donner naissance à un ADN double brin capable de s'intégrer dans le génome cellulaire. Elle est aussi responsable de la grande diversité du VIH, du fait de la survenue de nombreuses erreurs pendant les cycles de réPLICATION et de l'absence de fonction de correction.
- **La protéase virale PR** joue un rôle important dans la maturation de la particule virale. Il est obtenu après clivage de la polyprotéine Pol. Les polyprotéines Gag et Gag-Pol qui sont incorporées dans les virions immatures doivent être clivées par la PR pour produire des virions matures qui sont infectieux. Cette maturation se produit pendant ou peu après les bourgeons du virus de la cellule hôte. PR clive au niveau de plusieurs sites au sein de la polyprotéine Gag-Pol pour produire les sous-unités MA, CA, NC, et les protéines P6.
- **L'intégrase IN** va permettre l'intégration dans le génome de la cellule infectée de l'ADN néo synthétisé par la TI. Pour cela, l'enzyme coupe le génome cellulaire pour y intégrer le provirus par les séquences LTR qui constituent les points d'ancrage.

Le gène ***env*** (pour enveloppe) : c'est le gène le plus variable avec une longueur d'environ 2500pb. Il permet la synthèse des glycoprotéines de l'enveloppe virale à partir d'un précurseur intracellulaire. Il est caractérisé par un polymorphisme important qui permet au virus d'échapper au système immunitaire.

Les glycoprotéines Env sont synthétisées sous forme d'une poly protéine (gp160) qui est clivée par des protéases cellulaires vont donner à maturité la glycoprotéine de surface gp120 et la glycoprotéine transmembranaire gp41. Lors de l'assemblage du virus, le complexe gp120/gp41 est incorporé sous forme de pointes hétérotrimériques dans la bicouche lipidique des virions naissants. ⁽²³⁾

Le VIH-1 est entièrement dépendante de la protéine Env pour pénétrer dans les cellules. Le précurseur Env (ou gp160) génère les 2 glycoprotéines qui forment l'enveloppe virale⁽²⁵⁾ :

- **La glycoprotéine de surface Gp120**, est composée de 5 domaines (C1-C5) très bien conservés d'une souche à l'autre et, de 5 domaines hypervariables (V1-V5) qui forment

à leur base des boucles. La boucle V3 apparait dans le choix du tropisme viral et elle détermine l'efficience avec laquelle, le CD4 soluble peut bloquer l'infectivité de la souche virale.

- **La glycoprotéine transmembranaire Gp41**, contient un domaine N-terminal promoteur de la fusion membranaire entre le virus et la cellule hôte. Elle est liée aux régions hydrophobes des extrémités N-terminal de la **gp120**.

2.3.2. Les gènes de régulation et les gènes accessoires

Les gènes *vif*, *vpr*, *vpu*, *nef* sont des gènes accessoires alors que *rev* et *tat* codent pour les protéines virales régulatrices donc tous les rôles ne sont pas encore tout à fait élucidés ; mais leur implication dans le cycle répliquatif du virus a été décrite. Ces protéines semblent également participer à l'infectiosité du virus et à sa pathogénicité en modifiant l'expression des gènes cellulaires.

➤ **Le gène tat** (trans-activator of transcription), formé de deux exons, il code pour les protéines p16Tat et p14Tat, toutes deux fonctionnelles. La p14, synthétisée la première, se lie à l'élément TAR du LTR pour activer la transcription des ARNm viraux. Tat, petite protéine de base (86-102 résidus), améliore considérablement l'efficacité de la transcription virale.

Tat est une protéine de transactivation robuste dont l'activité de transactivation n'est pas limitée à des gènes du VIH-1 seul. En plus de la modulation des gènes du VIH-1, Tat semble réguler positivement un certain nombre de gènes viraux non-VIH, résultant en une activation du virus. En plus des missions de régulation de Tat dans la transactivation des gènes des virus, elle a été impliquée comme un modulateur de niveau d'expression d'un certain nombre de gènes cellulaires.⁽¹¹¹⁾

➤ **Le gène rev** (regulator of expression virus) est le second facteur de régulation nécessaire à l'expression du virus. Il code pour la phosphoprotéine pp20Rev qui s'accumule dans le nucléole de la cellule hôte et qui intervient dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes de structure assurant le transport des transcrits primaires ou mono-épissées du noyau vers le cytoplasme.

La protéine Rev a été longtemps reconnue comme essentiel pour la phase tardive du cycle de réplication du virus, en raison de sa forte augmentation de l'expression des protéines structurales. Tout de même, un certain nombre d'études récentes ont démontré

que Rev peut également interférer avec l'intégration de l'ADNc par transcription inverse dans le génome de la cellule hôte.⁽⁴⁹⁾

- **Le gène vif** (viron infectivity factor) est une petite phosphoprotéine de base de 23kD, qui est essentielle à la réplication virale et à la pathogénèse. La fonction la mieux caractérisée de Vif est sa capacité à neutraliser le facteur antiviral de la cellule hôte qui est l'APOBEC3G, ce qui rend les particules virales plus infectieuses. En outre, Vif peut réguler la transcription inverse et la phase avancée de la réplication de la particule virale et provoquer la cessation du cycle cellulaire en phase G2.⁽⁷¹⁾
- **Le gène vpr** (viral protein R) code pour une protéine de 14kD incorporée dans le virion et qui est localisé dans le noyau. Cette protéine contribue à la pathogénèse du VIH-1 à travers la transactivation des LTR, le transport du complexe de pré intégration dans le noyau, l'arrêt de la croissance cellulaire en phase G2 et l'induction de l'apoptose.⁽⁶⁶⁾
- **Le gène vpu** (viral protein U) est retrouvé dans le génome du VIH-1 et du SIV_{CPZ} et non chez le VIH-2. Elle est la plus petite des protéines codées par le VIH-1. Cette protéine transmembranaire interagit avec la molécule CD4 au niveau du réticulum endoplasmique rugueux (RER), entraînant sa dégradation par la voie du protéasome. Vpu joue un rôle de facilitateur pour la libération des virions à partir des cellules infectées. Cependant, la libération du virus est spécifique de certaines cellules, ce qui suggère que certaines cellules peuvent exprimer un facteur de restriction qui empêche la libération du virus en l'absence de *vpu*. La BST-2 (Bone Marrow Stromal antigen 2) ou tetherin a été identifiée comme étant ce facteur.⁽¹⁰⁴⁾
- **Le gène nef** (negative expression factor) code pour une protéine de 27kD myristillée et qui est une des premières synthétisées dans les cellules infectées. Il est l'un des gènes accessoires les plus importants. Le gène nef est nécessaire pour une forte réplication virale et par conséquent, contribue indirectement à la destruction des cellules T CD4+.

2.3.3. Les LTR

Le génome du VIH-1, comme tout rétrovirus, présente à chacune de ses extrémités une séquence appelée *Long Terminal Repeat* (LTR) ou longue répétition terminale. Les LTR, qui sont des régions non codantes, contiennent les éléments promoteurs qui contrôlent l'intensité de l'expression des gènes du virus et l'intégration aux gènes de la cellule hôte. Des séquences cibles sont présentes au sein des LTR :

- La séquence TAR est activée par le gène *tat* ;
- La séquence NF κ B, capable d'initialiser la rétrotranscription, est activée par les lymphokines (TNF) ou par des facteurs viraux (virus de l'hépatite B par exemple).

Le réticulum endoplasmique est le principal chaperon des LTR.⁽⁷³⁾

2.4. La variabilité génétique du VIH-1

La variabilité génétique du VIH-1 fut reconnue très tôt après sa découverte. Les virus isolés chez différents patients n'étaient pas génétiquement identiques et au sein d'un même patient, de multiples formes virales étaient identifiées. Dès 1986, on connaissait l'existence de deux types de virus, le VIH-1 le plus répandu dans le monde et le VIH-2 à localisation restreinte et essentiellement retrouvé en Afrique de l'Ouest.

Bien que le VIH-1 et le VIH-2 appartiennent au même sous-groupe des *Lentivirus*, ils ne présentent que 40 à 50% d'homologie génomique,⁽⁵¹⁾ et chaque type de virus est lui-même représenté par des virus génétiquement éloignés⁽⁴¹⁾. Ainsi le VIH-1 est divisé en 4 groupes de virus : les VIH-1 du groupe M (majoritaire), qui correspondent aux virus les plus répandus dans le monde, les VIH-1 du groupe N (non M et non O)⁽¹⁰⁸⁾ et du groupe O (Outlier)⁽²²⁾ qui ont été identifiés respectivement au Cameroun et dans les régions de l'Afrique Centrale, les VIH-1 du groupe P découvert récemment en 2009.⁽⁹⁴⁾

Les VIH du groupe M sont eux-mêmes représentés par différents sous-types (A, B, C, D, F, G, H, J et K) et sous sous-types (A1, A2, A3, A4, A5, F1, F2...) ; le sous-type C est le plus répandu dans le monde. L'infection simultanée d'un individu par deux sous-types différents de VIH-1 est possible et peut être responsable des événements de recombinaisons virales et engendrer des CRFs. De nos jours, 55 CRFs² ont été décrits dont le CRF02_AG est la plus répandue des CRFs dans le monde.⁽⁵⁵⁾ Par ailleurs, on note les URFs pour Unique Recombinant Forms qui sont des formes recombinantes retrouvées de façon sporadique chez des individus isolés.^(70, 98)

² <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html> (Consulté le 19.07.13)

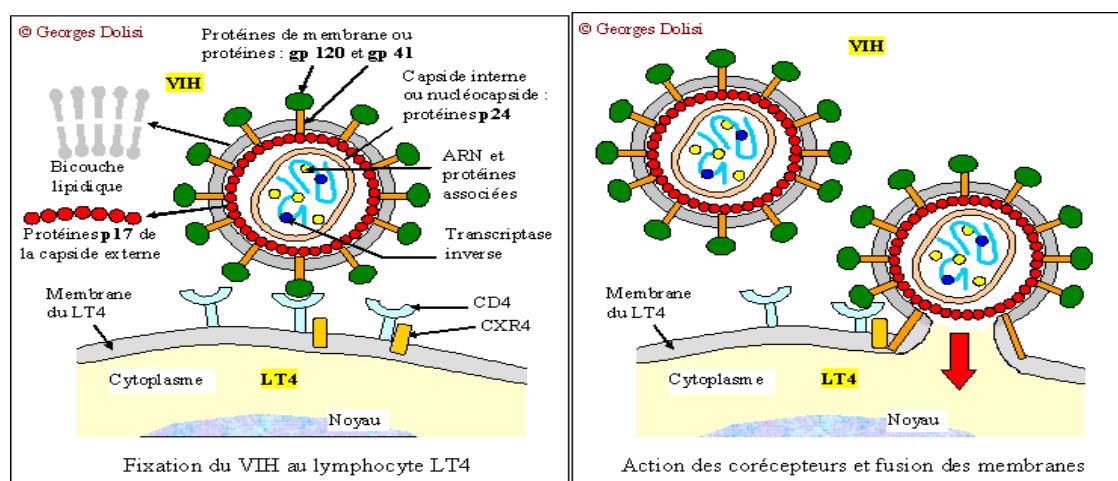
2.5. Le cycle répliquatif du VIH-1

Le cycle de réPLICATION du VIH-1 est un processus séquentiel soumis à la régulation par des protéines virales et cellulaires.

Le VIH est un rétrovirus qui a besoin d'intégrer le noyau de la cellule infectée pour détourner le fonctionnement cellulaire afin d'assurer sa réPLICATION.

L'infection virale peut être déCOMPOSÉE en plusieurs étapes correspondant chacune à un maillon essentiel du cycle de réPLICATION du virus et aboutissant à la formation de nouveaux virions.⁽⁹⁹⁾

- **L'attachement** (**Figure 3**) du virus à la cellule hôte se fait par une interaction spécifique entre la gp120 et son récepteur, la molécule CD4. Cette fixation induit des changements conformationnels permettant la reconnaissance de la gp120 par les co-récepteurs. Il y'a alors fusion entre la membrane virale et la membrane cytoplasmique cellulaire



3a

3b

Figure 3 : Schéma de la fixation (3a) et de l'entrée du VIH (3b)

http://georges.dolisi.free.fr/Physiopathologie/sida_infection.htm

- **La décapsidation et la transcription inverse** (**Figure 4**) : au cours de cet événement, le virus est partiellement et progressivement désassemblé dans le cytoplasme. C'est à partir des complexes obtenus qu'à lieu dans le cytoplasme la transcription inverse du génome viral. Grâce à un ARNt lysine comme amorce, la RT synthétise un brin d'ADN complémentaire de l'ARN viral et génère à chaque extrémité de longues répétitions terminales identiques (Long Terminal Repeat). La RNase H dégrade le brin d'ARN pendant qu'un deuxième brin d'ADN est constitué. Le génome viral

s'associe avec des protéines virales et cellulaires en un complexe nucléoprotéique, le complexe de pré-intégration.

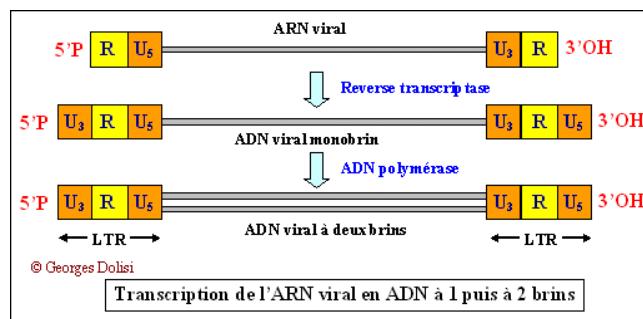


Figure 4 : Schéma de la transcription inverse

http://georges.dolisi.free.fr/Physiopathologie/sida_infection.htm

- **L'import nucléaire et l'intégration (Figure 5) :** après la transcription inverse, le génome viral est acheminé dans le noyau de la cellule sous forme de complexe de pré-intégration au noyau. L'ADN viral est intégré dans l'ADN chromosomique de la cellule infectée par l'action de l'intégrase virale. Le virus est alors sous sa forme de provirus.

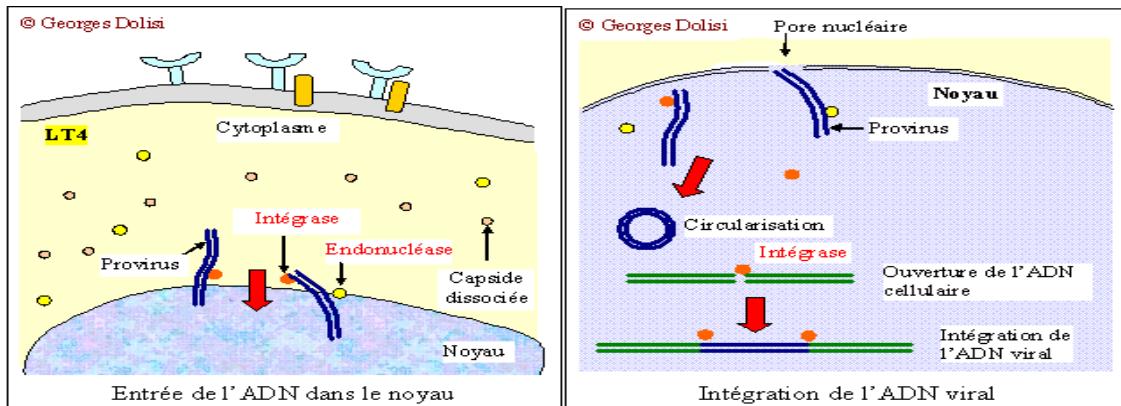
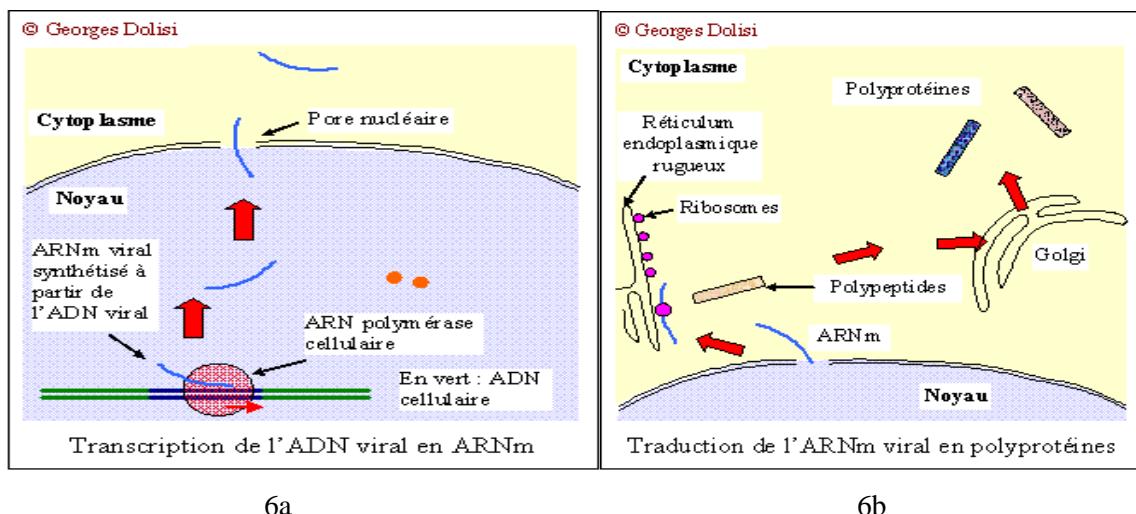


Figure 5 : Schéma de l'intégration

http://georges.dolisi.free.fr/Physiopathologie/sida_infection.htm

- **Transcription et traduction (Figure 6) :** à partir du promoteur viral situé en 5' du LTR, les copies intégrées d'ADN du VIH-1 servent de matrice pour la synthèse d'ARN messagers viraux grâce à l'ARN polymérase II et les interactions coordonnées de la protéine Tat et des facteurs de transcription.



6a

6b

Figure 6 : Schéma de la transcription (6a) et de la traduction (6b) du génome viral

http://georges.dolisi.free.fr/Physiopathologie/sida_infection.htm

➤ L'assemblage et le bourgeonnement (Figure 7) : les poly-protéines Pr55Gag et Pr160Gag-Pol, en association avec les protéines accessoires (Vif, Vpr et Nef) et le génome viral nouvellement synthétisé, se regroupent à la membrane puis s'assemblent avec les protéines de l'enveloppe, la gp120 et la gp41. C'est le Vpu qui stimule la relâche des nouvelles particules virales. La protéase virale clive les précurseurs protéiques Pr55Gag et Pr160Gag-Pol et la capside se condense puis adopte sa forme caractéristique en cône. Le virus peut alors entamer un nouveau cycle de réPLICATION.

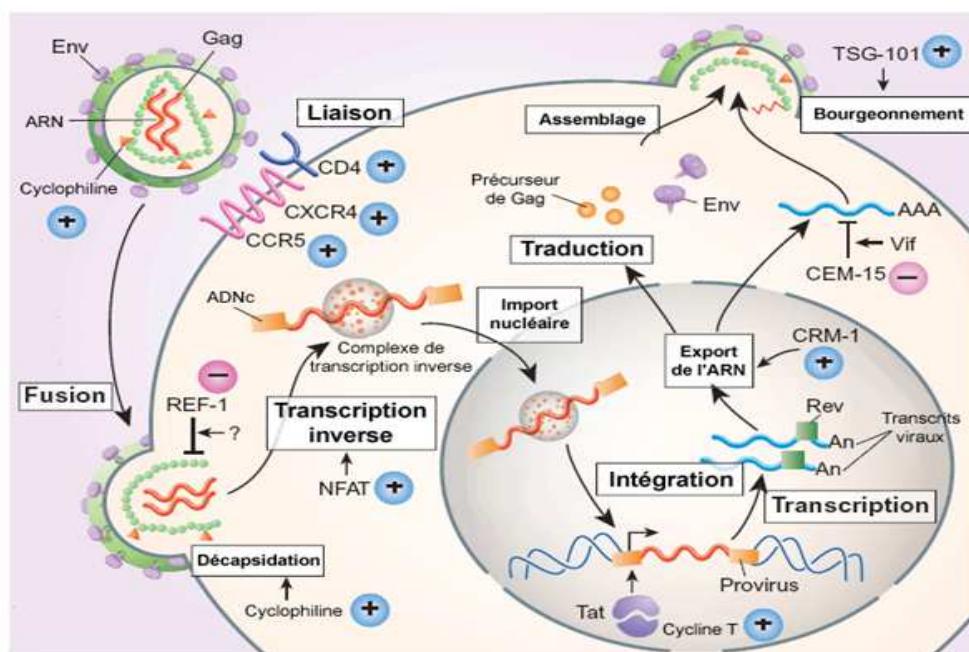


Figure 7 : Assemblage et bourgeonnement des nouveaux virions ⁽¹¹³⁾

2.6. Le tropisme du VIH-1

Les cellules sensibles à l'infection VIH sont principalement celles qui expriment à leur surface le récepteur CD4+ et l'un des co-récepteurs, CCR5 et/ou CXCR4.⁽⁸⁹⁾ Toute modification dans les préférences des corécepteurs ainsi que l'efficacité et le mécanisme d'interaction entre le VIH-1 et le CCR5 et/ou le CXCR4 a une influence significative sur le tropisme viral, la progression de la maladie et la réponse aux antagonistes du corécepteur.⁽⁴⁶⁾

La découverte du VIH-1 fut rapidement suivie par la caractérisation de son principal récepteur cellulaire, le CD4. Chacun des monomères de gp120 contient un site de liaison pour le CD4. Cette molécule s'exprime fortement sur les thymocytes et les lymphocytes TCD4+ matures, et plus faiblement sur les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules neuronales et les cellules gliales. Par ailleurs, le CD4 agit aussi comme ligand pour le Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II (CMH II). Le CCR5 et le CXCR4, deux co-récepteurs de chimiokines, sont apparus, au milieu des années 90, comme des éléments clés du processus d'entrée virale. Il s'est avéré que ces co-récepteurs coopèrent avec le CD4 lors du processus de fusion. Bien que d'autres récepteurs de chimiokines ont été également décrits (le CCR2b, le CCR3, le CCR8, le CXCR3, le CXCL16) le CXCR4 et le CCR5 sont les plus utilisés. L'emploi préférentiel de l'un ou de l'autre des co-récepteurs détermine le tropisme des souches virales (X4, R5, X4R5). Les souches R5 infectent uniquement des cellules exprimant le CCR5 à leur surface (macrophages, cellules dendritiques, cellules TCD4+ activées). Par contre les souches X4 ciblent et infectent exclusivement les cellules exprimant le CXCR4 (cellules T CD4+ naïves).

3. Physiopathologie de l'infection à l'infection à VIH-1

L'infection par le VIH-1 induit un déficit progressif conduisant à l'apparition d'infections opportunistes, et de néoplasies caractérisant le SIDA clinique. Le VIH a pour cibles les cellules du système immunitaire principalement celles exprimant le marqueur CD4+ c'est-à-dire les lymphocytes T CD4+, le monocyte-macrophage et les cellules dendritiques. La conséquence est une diminution importante du nombre et de la fonctionnalité de ces éléments protecteurs qui deviennent ainsi incapables de contrôler les agents microbiens. De plus, chez les sujets infectés, les lymphocytes T CD8+ non atteints entrent en apoptose.⁽⁴⁷⁾

L'infection à VIH-SIDA évolue en trois phases : la primo-infection, la phase de latence clinique et la phase d'immunodépression symptomatique aboutissant au SIDA. Chacune de ces phases est associée à une modification particulière du taux de CD4+.

3.1. La phase de primo-infection

La primo-infection correspond à la période située entre la transmission du virus et l'apparition d'une réponse immunitaire spécifique contre le virus. La primo-infection correspond à un ensemble de manifestations cliniques et biologiques s'apparentant à la mononucléose (fièvre, rougeur cutanée, fatigue, pharyngite, myalgie) accompagnés d'une virémie importante. Cette période est aussi caractérisée par une chute marquée du compte de cellules T CD4+ dans le sang périphérique et de la formation d'un réservoir de cellules T CD4+ infectées de façon latente par le VIH-1.

Le moment entre l'infection virale initiale et l'atteinte du niveau viral de base constitue la phase aiguë de la maladie.⁽⁵⁸⁾ Bien que certains individus soient asymptomatiques durant cette période, 50-90% des individus infectés développent des symptômes non spécifiques ressemblant à la grippe. La primo-infection se caractérise par une réPLICATION très active du virus, notamment dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques) donnant naissance à une virémie considérable. Mais celle-ci est vite contrôlée par une intense réactivité lymphocytaire T cytotoxique clonale, qui peut cependant, induire des effets immunopathologiques contribuant au déficit immunitaire car dirigé contre d'autres cellules immunitaires exprimant les antigènes viraux.⁽⁹¹⁾

3.2. La phase de latence clinique

Il ne s'agit pas d'une phase de latence virologique même si les taux de CD4 et de charge virale paraissent relativement constants. Le sujet infecté entre dans une période asymptomatique définie comme la période de latence clinique (aussi appelée chronique) qui persiste pendant plusieurs années (approximativement 7-10 ans) avant que ne surgissent les signes cliniques de la maladie. La virémie, qui est très basse au début de la phase chronique, demeure en lente progression tout au long de cette phase en raison d'une réPLICATION virale se poursuivant inexorablement.⁽⁵⁸⁾

Cependant, c'est durant cette phase que le virus va prendre progressivement le dessus sur le système immunitaire. Les cellules folliculaires dendritiques, les lymphocytes et les

macrophages constituent les principaux réservoirs de virus à partir desquels vont pouvoir s'appliquer les stratégies virales de destruction du système de défense de l'organisme à savoir :

- induction progressive d'une réponse CTL inappropriée, déplétion et dysfonctionnement des lymphocytes T CD4+.
- modification des propriétés biologiques du virus.
- variation antigénique conduisant à une diversification virale qui aggrave l'inefficacité de la réponse immunitaire.

3.3. La phase symptomatique aboutissant au SIDA

Ce stade se caractérise par l'apparition d'anomalies plus ou moins graves et non spécifiques, mais qui persistent chez les individus infectés. L'amaigrissement, le gonflement des ganglions, la diarrhée et la fièvre constituent les symptômes fréquemment rencontrés. Par ailleurs, les individus peuvent également développer un zona, une candidose oropharyngée, des crises d'herpès et une leucoplasie chevelue de la langue.⁽⁸⁷⁾

Le SIDA correspond au moment de l'effondrement du système immunitaire (déclin des lymphocytes T CD4+) et de l'augmentation de la virémie. Ce stade, le plus sévère de l'infection, se caractérise par le développement de maladies graves touchant diverses parties du corps. On retrouve notamment la Pneumonie à *Pneumocystis jiroveci* anciennement *carinii*, la tuberculose et la toxoplasmose... or, chez les individus immunodéprimés, le système immunitaire ne peut plus arrêter la multiplication de ces micro-organismes, puisque les cellules T CD4+ « mémoires » qui répondaient spécifiquement à ces antigènes ont été détruites et que le système n'est pas assez fort pour régénérer les cellules lymphocytes T effecteurs.

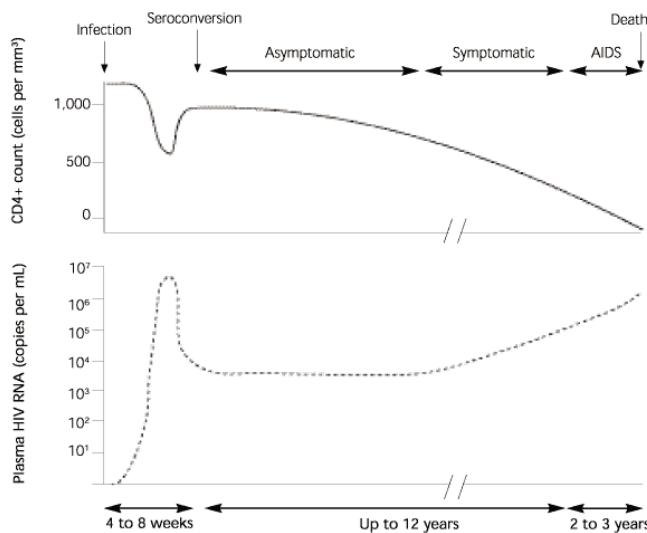


Figure 8 : Evolution des marqueurs biologiques au cours de l'infection.⁽⁸¹⁾

➤ **LES NON-PROGRESSEURS A LONG TERME (32)**

Quelques PVVIH dont le nombre approximatif se situant entre 5 et 7%, ont vécu pendant plus de 10 à 15 ans avec un taux de CD4 normal et sans manifester de symptômes de l'infection par le VIH. Ce sont les non-progresseurs à long terme.

Les sujets Non-Progresseurs à Long Terme (NPLT) sont définis comme des personnes infectées par le VIH, non traités et sans SIDA et avec un taux CD4 élevé et une faible charge virale plasmatique pendant 10 ans ou plus après l'infection. Les HIV Controllers (HIC) sont un sous-ensemble de (NPLT) qui ont en outre une virémie indétectable. ⁽⁷⁴⁾

Il semblerait qu'il existe des différences significatives en faveur des HIV Controllers (HIC) comparées aux patients progresseurs, au niveau de l'expression des CD40L, de la régulation des T (regs) et de CTLA-4. ⁽¹²³⁾

La lente évolution de l'infection à VIH chez les NPLT de race caucasienne, semble être due en partie à l'hétérozygotie du CCR5 allèle Δ32, probablement par diminution de l'expression du co-récepteur CCR5 sur les lymphocytes T CD4. ⁽¹²⁷⁾

4. Modes de transmission

Le VIH a été isolé dans la plupart des liquides biologiques humains : le sang, le plasma, l'urine, le LCR, l'urine, le sperme, les sécrétions vaginales, le lait maternel etc.

Toutefois, la transmission du VIH nécessite une porte d'entrée et le facteur déterminant du risque infectieux est la charge virale du produit biologique contaminant. Différents modes de transmission ont été décrits, le mode vertical et le mode horizontal.

4.1. Transmission horizontale

4.1.1. Par voie sexuelle

La transmission sexuelle à l'infection VIH se fait par l'intermédiaire des muqueuses buccale, génitale ou rectale, lorsqu'elles sont en contact avec les sécrétions sexuelles ou du sang contenant du virus. La muqueuse présente une certaine perméabilité vis-à-vis du VIH. De ce fait, des cellules infectées peuvent être retrouvées sous la muqueuse après une exposition non traumatique de l'épithélium vaginal. La muqueuse rectale, par son épithélium monocellulaire est plus susceptible à l'infection. La membrane rectale est beaucoup plus fine que la membrane vaginale et contient un grand nombre de lymphocytes, de macrophages et d'autres cellules susceptibles à l'infection VIH.

➤ Chez les homosexuels

Chez les homosexuels, plusieurs études ont rapportées que le risque de contamination augmente avec le nombre de partenaires. De plus, des études récents suggèrent que 6% à 8% pourraient être liées à des rapports oro-génitaux.^(36, 59)

En Afrique Subsaharienne, la prévalence globale à l'infection VIH chez les hommes ayant les rapports avec des hommes (HSH) était estimée à 17,9% contre 5% chez les adultes de la population générale.⁽¹¹⁾ En effet, les relations anales peuvent facilement provoquer des micro-plaies de la membrane, ce qui entraîne un contact direct du sperme de l'infecté avec le sang du partenaire.

➤ Chez les hétérosexuels

Les rapports sexuels non-protégés constituent la principale voie de transmission du VIH-1. Le risque de transmission par rapport anal serait environ 10 fois supérieur à celui d'un rapport vaginal, du fait de la finesse et de la structuration de la membrane rectale.⁽⁵³⁾

Selon une étude publiée en 1998, il semblerait que les hommes en période de séroconversion ayant des rapports sexuels par pénétration anale avec leurs partenaires (femmes), seraient plus contagieux que les personnes infectées asymptomatiques, quel que soit le type de contact.⁽⁶⁹⁾

4.1.2. Par voie sanguine

Elle concerne essentiellement trois groupes de populations : les usagers de drogues par voie injectable (IV), les hémophiles et les transfusés. Les professionnels de santé sont également concernés mais beaucoup plus rarement par accidents d'exposition au sang (AES) en milieu de soins et ou de laboratoire. Par ailleurs, il existe d'autres modes de transmission par voie sanguine qui sont moins importantes tels que, les tatouages, scarifications rituelles, excisions, circoncisions et infibulations.

Le dépistage systématique et obligatoire de tous les dons de sang a permis de réduire considérablement le risque de transmission du VIH par transfusion de produits sanguins. L'existence d'un risque résiduel de transmission du VIH n'est pas à écarter et ceci du fait de l'existence d'une fenêtre sérologique. L'amélioration constante de la sensibilité des tests de dépistage aurait permis un raccourcissement de la fenêtre sérologique, expliquant ainsi la diminution progressive du risque résiduel de transmission du VIH par transfusion de produits sanguins.⁽⁹³⁾

La transmission est liée à l'usage commun du matériel d'injections ainsi qu'à l'utilisation des objets nécessaires à la préparation de la drogue qui ont été préalablement contaminés par un autre utilisateur. Les usagers de drogues injectables seraient plus touchés par l'épidémie, avec une séroprévalence de l'infection à VIH au sein de cette population est 22 fois plus élevée que celle au sein de la population générale.⁽³⁾ Selon les résultats de certaines études épidémiologiques, il semblerait que les effets de la consommation de la drogue sur l'infection à VIH-SIDA peuvent être nocifs ou protecteurs ou bien dans certains cas équivoques. ⁽⁶²⁾

L'accident d'exposition au sang (AES) est défini comme étant tout contact percutané (par une piqûre, ou une coupure avec une aiguille, une lame de bistouri ou tout objet vulnérant), ou tout contact cutanéo-muqueux (par projection sur une muqueuse ou sur une surface de peau lésée), avec du sang ou tout liquide biologique contenant du sang et potentiellement contaminant. L'infectiosité (potentiel contaminant) d'un liquide biologique est moindre s'il s'agit d'un patient séropositif asymptomatique plutôt que d'un malade au stade de SIDA. ⁽³⁸⁾ L'infectivité (capacité infectieuse) estimé à la suite d'une exposition par piqûre d'aiguille semble variée de 0,00 à 2,38%. ⁽⁷⁾

La transmission peut se faire dans les 2 sens : sens patient - personnel de santé (risque professionnel) ou dans le sens : soignant – patient. Le risque professionnel étant faible (<0,01%) mais variable selon le stade clinique de la personne source, de la gravité de l'exposition au sang et de la présence ou non de gants. Le « **Syndrome de burn out (épuisement)** », lié aux conditions de travail (manque de temps, de repos, absence de récupérations après les gardes, harcèlement quotidien, stress quotidien, stress de responsabilités, crainte de la contamination etc.) est un facteur favorisant les accidents professionnels. ⁽³⁸⁾

4.2. Transmission verticale

Elle représente environ 90% de l'infection de l'enfant, et les 10% autres sont imputables aux abus sexuels, à la transfusion sanguine et toute autre exposition possible.

Il existe trois possibilités de transmission du virus de la mère à l'enfant :

- Transmission *in utero* du fœtus par passage hémato placentaire ;
- Transmission à l'accouchement
- Transmission via l'allaitement maternel (plus fréquent en Afrique)

Les traitements ARV permettent une prévention quasi complète de la transmission mère-enfant (TME). Le 1^{er} tournant de cette prévention a eu lieu en 1994 lorsqu'il a été démontré qu'un traitement par l'AZT permettrait de réduire de deux tiers le risque de transmission mère-enfant.⁽³¹⁾ Un second tournant a eu lieu en 1996 avec l'avènement des trithérapies.

Cependant, le risque de progression vers le SIDA ou le décès n'est pas augmenté par la survenue d'une, du moins dans les pays industrialisés.⁽¹⁰⁶⁾ Le risque naturel de transmission du VIH-2 à l'enfant est faible (1 à 4%) comparée à celui du VIH-1 (20 à 25%).⁽¹⁷⁾

La transmission mère-enfant a lieu principalement en fin de grossesse (un tiers des cas) et autour de l'accouchement (deux tiers des cas).⁽¹⁰²⁾ La transmission in utero a lieu surtout en fin de grossesse. On sait que la transmission n'a pas lieu au 1^{er} trimestre, hormis peut-être dans des cas de fausse-couche. La transmission au 2^{ème} trimestre, hormis peut-être des cas de fausse-couche. La transmission au 2^{ème} trimestre est possible, mais concerne des circonstances exceptionnelles, notamment l'accouchement prématuré.⁽¹⁵⁾ La transmission peut aussi se faire par voie transplacentaire malgré que le placenta constitue une barrière active contre le passage du virus, qui peut être pris par défaut par ces différents mécanismes.⁽⁷⁷⁾

Des études chez des jumeaux nés de mères séropositives ont montré que le risque de contamination serait plus élevé chez le premier né du fait de la durée du temps de délivrance et donc du contact avec les voies génitales de la mère plus marquée qu'avec le second. Un taux de transmission plus faible lors de l'accouchement par césarienne a été noté.^(45, 64, 107)

Dans des études africaines, le taux de transmissions est doublé chez les enfants allaités au sein.⁽⁸²⁾ Le risque de transmission est important dans les premières semaines, mais il persiste pendant toute la durée de l'allaitement.⁽⁶⁸⁾ Ce risque est augmenté en cas de déficit immunitaire maternel, de charge virale plasmatique maternelle élevée. La charge virale dans le lait maternel joue un rôle important. La transmission par l'allaitement peut être diminuée par un TARV chez la mère et par une prophylaxie étendue chez le bébé.

Actuellement l'OMS recommande l'option B+ qui suggère que « toutes mères séropositives doivent commencer une thérapie antirétrovirale indéfiniment quel que soit le taux de CD4 ».⁽⁵⁾

L'initiation précoce du traitement antirétroviral réduit le taux de transmission sexuelle et les manifestations cliniques du VIH-1.⁽²⁹⁾

5. Epidémiologie

5.1. Aperçu mondial

A l'échelle mondiale, 34 millions [31,4 – 35,9 millions] de personnes vivaient avec le VIH à la fin de l'année 2011, avec seulement 8 millions sous TARV pour 14,8 millions de personnes éligibles au TARV. En 2011, 2,5 millions [2,2 – 2,8 millions] de nouvelles infections VIH et 1,7 millions [1,5 – 1,9 millions] de décès liés au VIH avaient été enregistrés. Cela représente une baisse de 24% de la mortalité liée au SIDA par rapport à 2005 (où 2,3 millions [2,1 – 2,6 millions] de décès avaient été enregistrés). Cette baisse du taux de mortalité lié au VIH s'explique, par l'élargissement et l'intensification des traitements antirétroviraux ainsi que la diminution stable de l'incidence VIH depuis le pic de 1997.⁽³⁾

Selon les estimations, 0,8% des adultes âgés de 15 – 49 ans dans le monde entier vit avec le VIH bien que les circonstances de l'épidémie qui pèsent sur les pays et les régions continuent de varier considérablement. L'Afrique Subsaharienne reste l'une des régions les plus gravement touchées avec près d'un adulte sur 20 (4,9%) vivant avec le VIH, ce qui représente 69% des personnes vivant avec le VIH/SIDA dans le monde. La prévalence régionale de l'infection à VIH est près de 25 fois plus élevée en Afrique subsaharienne qu'en Asie mais environ 5 millions de personnes vivent avec le VIH dans l'ensemble de l'Asie du Sud, du Sud-Est et de l'Est.

Après l'Afrique subsaharienne, les régions les plus fortement touchées sont les Caraïbes, l'Europe de l'Est et l'Asie Centrale où 1% des adultes vivait avec le VIH en 2011.⁽³⁾ Les pays réalisent des progrès historiques dans la lutte contre l'épidémie de SIDA avec en 2011 une réduction de 700 000 nouvelles infections à VIH par rapport à 2001 dans le monde entier.

5.2. En Afrique Subsaharienne

Au cours des dix dernières années, le paysage des épidémies nationales de VIH a radicalement changé, en mieux dans la plupart des pays, en particulier en Afrique Subsaharienne. On note une réduction de 32%, du nombre de personnes décédées de causes liées au SIDA entre 2005 et 2011 (*soit 1,2 millions en 2007*).⁽³⁾

Entre 2001 et 2011, 25 pays à revenus faibles et intermédiaires ont réduit de 50% leur taux de nouvelles infections à VIH. Plus de la moitié de ces pays se situent en Afrique Subsaharienne, une région qui concentre la majorité de nouvelles infections.

Entre 2001 et 2011, le taux de nouvelles infections à VIH a diminué de 73% au Malawi ; de 71% au Botswana, de 68% en Namibie, de 58% en Zambie, de 50% au Zimbabwe. L’Afrique du Sud, le pays le plus durement touché par l’épidémie de VIH, a réduit son taux de nouvelles infections à 41%. Au Swaziland, le pays affichant la prévalence la plus élevée dans le monde, les nouvelles infections ont baissé de 37%. ⁽³⁾

En Afrique centrale et occidentale : le Ghana a enregistré les meilleurs résultats avec une baisse de 66%, suivi du Burkina Faso avec 60% et de Djibouti de 58%. La République Centrafricaine, le Gabon, le Rwanda et le Togo ont atteints des réductions comparables de plus de 50%. Au cours de dix dernières années, l’Ethiopie a atteint une diminution de 90% dans le taux de nouvelles infections. Malgré une baisse de 25% en Afrique Subsaharienne, en 2011, la région représentait 72% de nouvelles infections à VIH dans le monde. ⁽³⁾

5.3. Au Sénégal

Au Sénégal, la prévalence du VIH dans la population générale est estimée à 0,7%, et elle est relativement stable dans la population générale. ⁽⁴⁾ Toutefois, la prévalence reste élevée dans les groupes sensibles : 18,5% chez les professionnelles du sexe, 21,8% chez les MSM (Men have Sex with Men) et 9,2% chez les usagers de drogues injectables.

Il s’agit donc d’un pays à « épidémie concentrée », avec d’une part des prévalences différentes entre la population générale et les groupes sensibles, et d’autre part avec des prévalences variables d’une région à une autre (Dakar 0,6%, Kolda 2,8%, Ziguinchor 3%...) ⁽⁴⁾

L’infection à VIH au Sénégal est caractérisée par la co-circulation des deux types de virus et par une épidémie peu évolutive. La séroprévalence chez les femmes de 15 – 49 ans est supérieure à celle des hommes de la même tranche d’âges: 0,8% contre 0,6% soit un ratio de 1,6 en faveur des femmes. ⁽⁴⁾

Dans l’ensemble, la prévalence augmente avec l’âge passant de 0,1% chez les personnes âgées de 15 – 19 ans à 1,9% chez celles de 45 – 49 ans. Ces variations de prévalence selon l’âge diffèrent selon le sexe avec un taux de 2,4% chez les femmes âgées de 45 – 49 ans (taux plus important par rapport aux hommes de la même tranche d’âge. En somme, il est constaté que les jeunes de 15 – 24 ans restent peu touchés par le VIH avec une prévalence de 0,2% (0,3% chez les hommes et 0,1% chez les femmes). ⁽⁴⁾

6. Diagnostic biologique

En biologie médicale, le diagnostic des infections à VIH chez l'adulte est dans la grande majorité des cas, basé sur la détection des anticorps. Chez les nouveau-nés de mères séropositives, le diagnostic est basé sur des techniques plus complexes pour mettre en évidence la présence du virus.

6.1. Diagnostic indirect

6.1.1. Tests de dépistage

Les tests de dépistage sont basés sur la détection des anticorps anti-VIH (réaction Antigène/Anticorps). Ces tests sont effectués de façon systématique au cours des dons de sang depuis 1985.

Le principe repose sur une réaction immuno-enzymatique de type ELISA (*Enzyme-Linked Immuno-Sorbet Assay*). Il s'agit de la recherche d'anticorps anti-VIH qui utilisait comme antigène, un lysat de virus obtenu par culture cellulaire (tests de 1^{ère} génération) ou des protéines recombinantes obtenues par biotechnologie (tests de 2^{ème} génération). Ces tests ne détectent que les anticorps de classe IgG. Il existe des tests de 3^{ème} génération qui permettent de détecter toutes les classes d'anticorps, en particulier les IgM, et de déceler la séroconversion 5 jours en moyenne avant les tests de 2^{ème} génération. Les tests de 4^{ème} génération combinent à la fois, la détection des anticorps anti VIH et la détection de l'antigène p24.

La sensibilité et la spécificité du test ELISA sont d'environ 99% ; des résultats faussement positifs se produisent chez les femmes multipares, les sujets récemment vaccinés contre la grippe ou l'hépatite B ou en cas de maladie auto-immune. Les anticorps sont détectables 6 mois après l'infection chez 95% des patients ; au cours de l'évolution, lorsque s'installe une immunodéficience marquée, on observe des résultats faussement négatifs.⁽³⁹⁾

6.1.2. Tests de confirmation

En cas de test ELISA positif ou incertain, le résultat doit être confirmé par le « **Western Blot** » qui est la technique de référence, et ayant l'avantage d'être plus spécifique. Il consiste en la recherche des anticorps spécifiques dirigés contre les différentes protéines virales codées par les gènes de structure. Dans la plupart des cas, ce test confirme l'ELISA et met en évidence la réactivité avec toutes les protéines virales. La réactivité isolée à 2 protéines (souvent gp160 et gp24/25, ou gp120/110 et gp41) s'observe en cas de séroconversion (dans les 6 à 12 semaines

après la contamination). La réactivité à une seule protéine (p25 isolée) peut signifier une séroconversion en cours ou une infection au VIH-2. Chez le sujet qui évolue vers le SIDA déclaré, la réactivité anti-p24 décroît. Enfin, l'absence de réactivité au Western Blot permet d'affirmer la séronégativité.

Mais il existe également d'autres tests de confirmation : le LIA (*Line Immune Assay*) à base de peptides synthétiques, le RIBA (Recombinant Immuno Blot Assay) à base de protéines recombinantes et le RIPA (Radio Immuno Precipitation Assay) utilisant un lysat viral radio marqué et ayant l'avantage de différencier les infections mixtes.⁽³⁹⁾

6.2. Diagnostic direct

Dans certaines situations, le sérodiagnostic n'est daucun secours pour apporter la certitude d'une infection par le VIH ; c'est le cas de la primo-infection ou pour le cas d'un nouveau-né de mère séropositive avant la séroconversion. Il existe plusieurs alternatives : Ag p24, l'isolement par culture virale et les techniques d'amplification.

6.2.1. Détection de l'Ag P24

La recherche de l'antigène p24 est une technique de détection précoce de l'infection. L'antigénémie p24, outre le dépistage précoce d'une infection par le VIH (lors de la phase de primo-invasion ou chez le nouveau-né de mère séropositive), pourrait également avoir une valeur pronostique : l'antigène p24 disparaît du sérum après la primo-invasion (présence chez moins de 15% de séropositifs asymptomatiques) et ne réapparaît que lorsque l'infection par le VIH évolue jusqu'au SIDA (présence chez environ 60% des cas de SIDA).^(18, 97)

Le test de détection de l'antigène p24 a été affiné au point que les banques de sang l'utilisent sur tout le territoire des Etats-Unis avec une combinaison de tests d'anticorps anti VIH-1/VIH-2 pour contrôler les dons de sang.⁽³³⁾

6.2.2. Isolement du VIH par culture cellulaire

Cette technique requiert un laboratoire ayant un plateau technique élevé, ceci en raison des risques liés aux manipulations.⁽²⁰⁾

L'isolement du VIH en culture de cellules se fait par co-culture, c'est-à-dire la culture de lymphocytes de la personne qui doit être testée et celle de lymphocytes provenant d'un donneur sain. La co-culture est considérée comme positive, lorsque l'on obtient des hauts niveaux

de transcriptase inverse virale ou de protéine p24 dans le milieu de croissance après au moins deux tests consécutifs.

6.2.3. Détection des acides nucléiques viraux

Elle peut être qualitative ou quantitative et repose sur des techniques d'amplification génique (ADN ou ARN) ou d'amplification du signal.

Il est admis que le niveau de réPLICATION virale est étroitement corrélée à l'aggravation clinique progressive constatée au cours de l'infection par le VIH.⁽⁸⁵⁾ La détermination de la quantité de virus présente dans l'organisme est donc un examen essentiel, en ce sens qu'il permet d'évaluer un traitement antirétroviral en cours chez un patient.

Il existe de nombreuses trousse commerciales permettant la détection/quantification de la charge virale du VIH, parmi lesquelles, on peut citer entre autre :

- ✓ **Cobas Taqman® des laboratoires Roche** qui est une plateforme de PCR en temps réel permettant de détecter/quantifier l'ARN des sous types du VIH-1 du groupe M au niveau du gène *gag* et de la région LTR grâce à l'utilisation d'un standard interne. Les limites de détection vont de 47 à 10 000 000 de copies/ml.
- ✓ **La plateforme m2000rt de Abbott** qui utilise également la PCR en temps réel afin de générer un produit amplifié du génome du VIH-1 dans les échantillons cliniques. Il permet de détecter/quantifier les sous types du groupe M et les isolats du groupe O grâce à des sondes fluorescentes partiellement double brin et cible la région *pol Intégrase* en présence d'un standard interne. Les limites de détection vont de 40 à 10 000 000 de copies/ml.
- ✓ **Quantiplex ou Versant HIV RNA bDNA 3.0® de Siemens** : il s'agit d'une technique semi-automatique d'hybridation de l'acide nucléique et d'amplification du signal utilisée pour quantifier l'ARN du VIH-1 dans le plasma humain. La séquence cible se situe au niveau du gène *Pol* avec des limites de détection allant de 50 à 500 000 copies/ml. L'ARN génomique libéré des virions est capturé sur un support solide (micro puits) par l'intermédiaire des sondes de capture spécifiques constituées d'oligonucléotides de synthèse. Une série de sondes cibles permet de réaliser l'hybridation de l'ARN viral avec différentes séries de sonde réalisant un complexe d'ADN branché (bDNA). La détection résulte de l'émission de signaux lumineux provenant de la dégradation d'un substrat grâce à l'action d'une enzyme fixée sur une des sondes.

- ✓ **NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification)** : l'amplification par NASBA est une technique d'amplification des acides nucléiques pour la détermination de l'ARN viral, après une phase linéaire, avec l'action combinée de trois enzymes à savoir :
 - La reverse transcriptase (AMV-RT) permettant la synthèse d'une matrice d'ADN à partir d'ARN ou d'ADN ;
 - La RNase H permettant la dégradation de l'ARN de l'hybride ADN/ARN ;
 - La T₇ RNA Polymérase (contenant le promoteur T₇) permet la synthèse d'ARN à partir de la matrice d'ADN.

Seul, les laboratoires Biomérieux ont développé une trousse commerciale se basant sur cette technologie NASBA. Le test Nuclisens EasyQ HIV-1 Version 2.0, elle combine une extraction magnétique de l'ARN suivie d'une amplification isothermique (NASBA) et une détection en temps réel. Elle cible la séquence ***gag*** et permet la quantification aussi du VIH-1 que du VIH-2 dans une marge de 10 à plus de 100 000 000 copies/ml pour le plasma et de 500 à 21 000 000 copies/ml pour les DBS.

L'amplification thermique est couplée à une détection-quantification en temps réel de l'ARN. Cette détection se fait par les balises moléculaires portant un marqueur fluorescent et qui s'ouvrent en présence d'amplicons d'ARN. L'augmentation de la fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'ARN générée pendant cette réaction. En plus, il détecte le VIH-1 de groupe N, de groupe M de sous types : A, B, C, D, F, G, H, J, K et les formes circulantes CRF02_AG, CRF01_AE et CRF14_BG et le VIH-2.

Chapitre II : Traitement de l'infection à VIH

1. Les molécules antirétrovirales

Dès 1987, la première molécule antirétrovirale (ARV) a été mise sur le marché. Il s'agit de la Zidovudine ou AZT. Par suite de résistances établies du virus à la seule molécule d'AZT, plusieurs autres molécules sont aujourd'hui disponibles et utilisées en association. Les nouvelles molécules disponibles, ayant de plus des cibles virales différentes, ont permis d'obtenir des résultats très encourageants dans le cadre des associations thérapeutiques et d'améliorer considérablement l'évolution des patients.⁽¹⁴⁾ Ces molécules sont regroupées en quatre familles d'inhibiteurs actuellement :

- Des inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (IN)
- Des Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INN)
- Des inhibiteurs de protéases (IP)
- Des inhibiteurs de fusions (IF)
- Des inhibiteurs d'intégrase (IIN)

1.1. Les inhibiteurs nucléosidiques de la reverse transcriptase

Ce sont des analogues des nucléosides naturels dont ils diffèrent par l'absence de groupement l'hydroxyle en 3'. Ils agissent en compétition, après divers métabolismes, au niveau du site de polymérisation de l'enzyme et bloquent ainsi l'elongation de l'ADN. Ils agissent sur les deux types de virus : VIH-1 et VIH-2. Une variante de cette classe est représentée par les inhibiteurs nucléotidiques ne nécessitant pas toutes de métabolisme d'activation. Elle est représentée par le Ténofovir actif même sur les virus résistants à cette classe d'inhibiteurs nucléosidiques.⁽⁹⁵⁾

1.2. Les inhibiteurs non nucléosidiques de la reverse transcriptase

Non compétitifs, ils agissent sans métabolisme ou transformation préalables sur le site allostérique et modifient ainsi la conformation du site actif de la RT bloquant par ricochet sa fonction de polymérisation. Ils sont actifs uniquement sur le VIH-1.⁽¹³⁾

1.3. Les inhibiteurs de protéases (IP)

Ce sont des peptides synthétiques dont l'action peut être double : ils peuvent s'insérer au niveau du site catalytique ou à l'interface entre les deux sous-unités du dimère qui constitue l'enzyme et bloque ainsi son activité protéolytique de façon sélective et réversible.

La présence de cette IP empêche la maturation des précurseurs de protéines; ce qui bloque alors la formation de particules virales matures ou bien entraîne la formation de particules virales immatures et non infectieuses. ^(21, 96)

1.4. Les inhibiteurs de fusions et d'entrée (IF et IE)

Ces inhibiteurs agissent de manière à empêcher l'entrée du VIH dans la cellule hôte. Ils sont conçus de manière à bloquer les récepteurs de fusion dont le VIH se sert pour s'accrocher aux cellules. Il s'agit d'analogues de la chaîne transmembranaire CD4. ⁽¹¹⁰⁾

1.5. Les inhibiteurs de l'intégrase (IIN)

La classe des inhibiteurs de l'intégras, ou anti-intégras, comprend à l'heure actuelle quatre molécules ciblant l'enzyme intégras du VIH :

- le raltegravir (commercialisé sous la marque Isentress® mais également connu sous le nom de code MK-0518);
- l'elvitégravir (noms de code : GS 9137 ou bien JTK-303), en phase III;
- le dolutégravir (GSK-572 ou bien S/GSK1349572), en phase III;
- le MK-2048, apparemment abandonné.

Ces molécules bloquent l'intégration de l'ADN proviral au génome de la cellule infectée. ^(63, 114)

2. Le traitement

L'association recommandée comprend 3 ARV, ce traitement antirétroviral (ARV) ne fait que ralentir le processus de réplication du virus. Il ne bloque en aucun cas la réplication virale qui continue lentement avec la production de variants (étant donnée la grande variabilité génétique du virus) et par conséquent, une seule modification ponctuelle (mutation) peut parfois induire une résistance à une molécule antirétrovirale.

Le traitement a pour but essentiel de réduire considérablement et durablement la réplication virale. C'est généralement une association de deux inhibiteurs nucléosidiques de la

transcriptase inverse et un inhibiteur de la protéase. Mais il existe d'autres associations qui ont prouvé leur efficacité.

Dans les pays en développement les combinaisons de première ligne de traitement sont composées de deux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse et d'un inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse. Les associations avec inhibiteurs de protéase sont réservées pour les traitements de deuxième de ligne.

3. Prise en Charge des PVVIH au Sénégal

3.1. Présentation de l'ISAARV

L'ISAARV (Initiative Sénégalaise d'Accès aux Antirétroviraux), née d'une volonté gouvernementale, a été créé en 1998, dans un contexte où le consensus international préconisait dans les pays du Sud la prévention plutôt que le traitement du SIDA. La mise en place de programmes d'accès aux ARV (Antirétroviraux) mettait en avant un certain nombre de problèmes de santé publique, liés notamment (1) à l'insuffisance des connaissances scientifiques d'alors concernant l'efficacité de ces thérapies à long terme et dans les contextes sanitaires des pays du Sud, (2) la complexité de traitements devant à priori être poursuivis à vie et exigeant un suivi médical lourd, (3) à la nécessité d'un bon niveau de développement des infrastructures sanitaires pour la mise en place des traitements, (4) et ainsi qu'au coût des médicaments. Comme tout programme sanitaire, le programme d'accès aux ARV devaient faire la preuve qu'il pouvait souscrire aux quatre exigences de santé publique que sont : l'équité, un rapport coût-efficacité optimal, l'accessibilité et l'acceptabilité pour les populations concernées et la pérennité.

3.1.1. Historique

C'est dans ce contexte dubitatif que le gouvernement Sénégalais s'est fixé pour objectif de relever le défi que représente l'utilisation des ARV dans la prise en charge de l'infection par le VIH au sein des structures de soins Africains.

C'est ainsi que le Sénégal fut le 1^{er} pays d'Afrique Sub-saharienne à mettre en place un programme public de distribution de médicaments antirétroviraux sur la base d'un engagement gouvernemental, en créant « **l'Initiative Sénégalaise d'Accès aux ARV (ISAARV)** ».

L'expérience positive des trois premières années de fonctionnement du programme d'accès aux ARV, limitée à 3 sites Dakarois (le service de Médecine Interne de l'Hôpital Principal, le service des maladies infectieuses de l'Hôpital Fann et le centre de traitement

ambulatoire CTA) et à quelques centaines de bénéficiaires ont encouragé les pouvoirs publics dans leur engagement d'élargir l'accès au programme. Grâce à cette expérience positive, le CNLS a projeté l'extension du programme dans la région de Dakar et la décentralisation des sites de PEC dans les capitales régionales avec notamment le 1^{er} site décentralisé en région ouvert à Kaolack en 2001.⁽⁴⁾

L'inscription des ARV et des réactifs de dépistage dans la liste des médicaments essentiels ainsi que la gratuité des ARV et des examens immuno-virologiques ont été déterminants dans le processus de décentralisation. Les efforts de décentralisation déjà entrepris par le Gouvernement du Sénégal ont été renforcés dans le cadre de sa participation à l'Initiative « 3 en 5 » de l'OMS.⁽⁸⁸⁾

3.1.2. Réalisations jusqu'à ce jour

Au bout de ces 15 ans de fonctionnement, l'ISAARV présente un bilan plutôt positif avec la décentralisation de la PEC et de l'augmentation considérable des sites et un certain nombre de sites offrant un paquet complet (Conseil, Dépistage et ARV).

Selon le rapport de l'ONUSIDA 2012, la couverture universelle de TARV est définie par une couverture de trithérapie $\geq 80\%$. Le Sénégal quant à lui, présente un taux de 78%.⁽³⁾ Avec une couverture de 100% du test de dépistage au niveau des centres de santé et hôpitaux, et de 72% au niveau des postes de santé.

✓ Evolution des sites de PEC

Le programme de décentralisation de la dispensation des ARV a débuté en 2001 au niveau des hôpitaux régionaux, renforcée en 2003 par la gratuité des ARV, du dépistage du VIH et du taux de CD4, suite à une décision gouvernementale. Cette politique entre dans le cadre du Plan Stratégique National (PSN) 2002-2006.

D'après la figure 9, on note une augmentation de 106 sites de PEC entre les années 2002 et 2011.

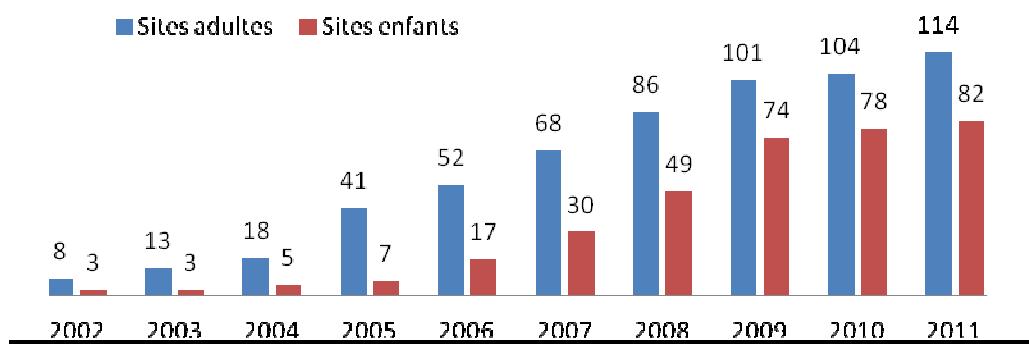


Figure 9 : Evolution des sites de PEC ⁽⁴⁾

✓ Evolution du nombre de patients sous ARV

En 2004, 74% des patients étaient prise en charge à Dakar. Depuis 2008 on note une inversion de la tendance avec plus de la moitié des patients suivi dans les régions. En 2011, 62% des patients sous ARV provenaient des régions. ⁽⁴⁾

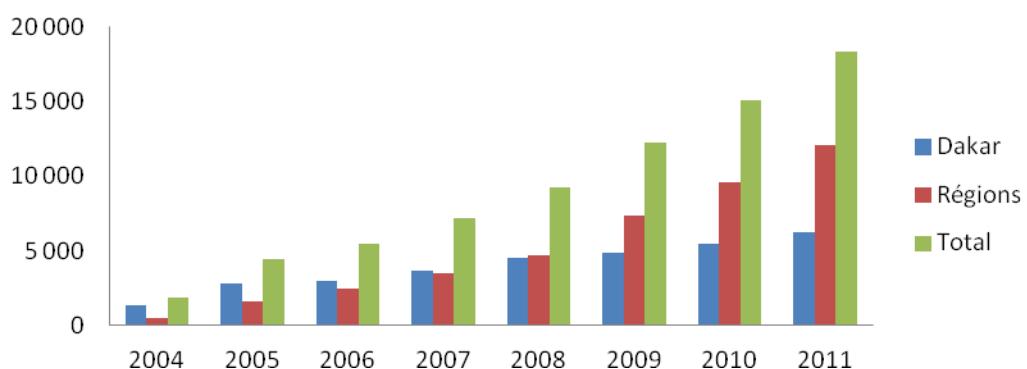


Figure 10 : Evolution du niveau de décentralisation de patients sous ARV ⁽⁴⁾

✓ Taux de couverture en ARV

Malgré les efforts consentis, la couverture des besoins en ARV reste encore modeste sur le plan national avec un taux de 78% en 2011. Ceci s'explique par l'augmentation considérable des patients à mettre sous TAR après les nouvelles recommandations de l'OMS ($CD4 < 350/\text{mm}^3$).

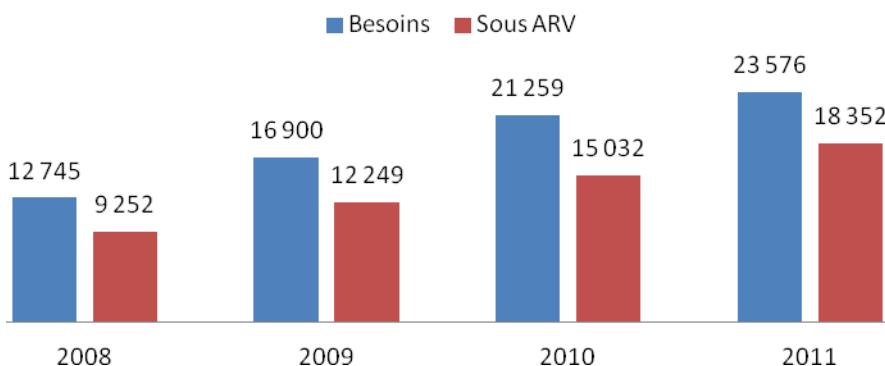


Figure 11 : Taux de couverture de mise sous ARV des PVVIH⁽⁴⁾

3.2. Prise en charge des PVVIH

Chez les patients dépistés positifs, les recommandations concernant le suivi biologique des PVVIH, se résument à un bilan biochimique (Transaminases, créatinémie et glycémie), un bilan hématologique avec un hémogramme complet, un suivi immunologique, un suivi virologique, un diagnostic des infections opportunistes, l'évaluation de la toxicité aux ARV, l'appréciation de la résistance aux ARV ; mais les plus importants sont le suivi immunologique et le suivi virologique.

Le suivi immunologique repose essentiellement sur la numération des Lymphocytes T CD4+ en utilisant essentiellement la technique de cytométrie en flux et un taux de CD4+ ≤ 350 cellules/mm³ (avec ou sans symptômes cliniques) est un critère de mise sous ARV.

Le traitement ARV administré est basé sur les recommandations de l'OMS. En 1^{ère} intention, il doit comporter un INNTI plus deux INTI dont l'un d'eux doit être la Zidovudine (AZT) ou le Tenofovir.

- AZT ou TDF + 3TC ou FTC + EFV+++ ou NVP
- Femmes enceintes : AZT + 3TC + EFV ou NVP+++ 1er trimestre de grossesse

En cas d'échec de la première ligne de traitement, le traitement de 2^{ème} intention doit associer un IP potentialisé par du Ritonavir et deux INTI dont l'un doit être l'AZT ou le TDF.

- TDF + 3TC ou FTC + ATV/r ou LPV/r
- AZT + 3TC ou FTC +ATV/r ou LPV/r

Sous traitement ARV, le suivi biologique des patients inclus également la détermination de la charge virale plasmatique pour apprécier l'efficacité du traitement et détecter au besoin les cas d'échec virologique précoce. Cette détermination est réalisée à la mise sous traitement pour avoir la charge virale de base, au bout d'un mois, à 6 mois puis tous les 6 mois. Le succès du traitement est donnée par une CVP indétectable c'est-à-dire <50 copies/ml après 6 mois de

TARV selon les recommandations du RESAPSI.⁽⁸⁷⁾ A l’opposé, une CVP supérieure à 1 000 copies/ml de façon répétée suggère une mauvaise observance du patient au traitement ou bien un échec thérapeutique qui amène à changer de schéma thérapeutique.

3.3. Utilisation du papier buvard comme support de prélèvement

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. Les travaux de GUTHRIE et GARRICK ont montré leur utilisation dans le dépistage des maladies métaboliques et génétiques chez le nouveau-né.^(42, 50)

Des études récentes montrent que les prélèvements DBS ont été largement utilisés ces dernières années dans le diagnostic sérologique^(52, 54, 76) et moléculaire^(56, 75) ainsi que dans le suivi virologique des PVVIH.^(60, 101)

Les nombreuses difficultés rencontrées au cours des prélèvements et traitements des échantillons veineux sur tube (prélèvement de sang invasif, volume de sang insuffisant, l’existence d’un seul 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.

Pour accompagner la prise en charge effective des PVVIH et de décentralisation des soins et du suivi virologique, le Gouvernement du Sénégal a opté pour des techniques alternatives tel que le papier buvard, permettant le démarrage et le suivi d’un traitement antirétroviral éventuel le plus rapidement possible.

➤ Propriétés du Papier buvard

Le papier buvard est un papier poreux capable d’absorber par capillarité une quantité de liquide. Plusieurs types de papiers sont utilisés dans la collecte et le transport des prélèvements de sang dont : le Whatman 903 (W-903), Ahlstrom Grade 226 (A-226), Munktell TFN (M-TFN), FTA etc. Selon l’étude de *Erin Rottinghaus et al, 2013*, des performances similaires ont été obtenues avec ces 3 types de papier buvard, pour la quantification de la charge virale mais le M-TFN a montré une efficacité supérieure pour le test de génotypage.⁽¹⁰⁰⁾

Le papier buvard utilisé doit avoir les propriétés suivantes: ^(60, 67, 79)

- la surface doit être lisse et résistante, sans fibre perdue ;
- doit être résistant aux acides et bases fortes ;
- doit avoir une composition en cendre quasi-inexistante (0,006%) ;
- fabriqué à partir de linters de coton et de cellulose ;
- doit avoir une certaine capacité de rétention et
- une résistante accrue à l'humidité.

➤ 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 ;⁽¹²¹⁾
- la stabilité des anticorps et de l'ADN dans le sang total sur papier buvard a été largement prouvée ;⁽¹²¹⁾
- 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 ;⁽¹²¹⁾
- les DBS ont été utilisés avec succès dans beaucoup de travaux pour la quantification de l'ARN viral.^(60, 67, 79)

DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL

Chapitre I : Contexte, Justificatifs et Objectifs de l'Etude

1. Contexte et Justificatifs de l'étude

Depuis l'avènement de la pandémie à VIH SIDA, la prévention a été érigée comme le meilleur moyen de lutte contre la pandémie. La prise en charge des personnes infectées est devenue ensuite une priorité de plus en plus pressante.

Les efforts consentis par le Gouvernement du Sénégal dans la prévention se sont traduites par une prévalence basse et stable (0,7%) et la volonté politique forte de l'Etat dans la prise en charge qui s'est traduite en 1998 par la mise en place d'un programme d'accès aux ARV dénommé ISARRV.

Au Sénégal, depuis le début de l'ISAARV, plusieurs trousse commerciales sont utilisées pour la quantification de l'ARN viral plasmatique du VIH, tel que le Cobas Taqman des laboratoires Roche, Abbott Real Time HIV-1 des laboratoires Abbott, le Quantiplex ou Versant HIV RNA bDNA 3.0 des laboratoires Siemens et le Nuclisens EasyQ HIV-1 Version 2 laboratoires Biomérieux.

Les laboratoires Biomérieux ont validé l'utilisation d'un volume de 100 μ l de plasma qui serait l'équivalent de 2 spots de DBS saturés chacun avec 50 μ l de sang total, pour quantifier la charge virale. Les valeurs obtenues avec 100 μ l de plasma et les 2 spots de DBS (saturés chacun avec 50 μ l de sang total) avec la version 1.2 ne présentent pas une différence statistiquement significative, les valeurs obtenues restant acceptables.⁽⁶⁰⁾

La version 2.0 du Nuclisens EasyQ HIV-1 récemment développer donne de meilleurs résultats que la version 1.2 tant avec le plasma qu'avec les spots de sang total séchés.⁽¹⁹⁾

Pour faciliter encore les prélèvements sur DBS, nous nous sommes proposé de comparer les valeurs des charges virales obtenues sur les prélèvements DBS avec différentes prises d'essai de sang total (50, 75, 100 et 150 μ l). Les valeurs des charges virales obtenues avec ces différents spots de sang séchés ont été par la suite comparées avec les valeurs obtenues avec 100 μ l de plasma, considéré comme référence. Ceci en vue d'identifier le volume de saturation de sang sur carte, qui corrèle le mieux avec 100 μ l de plasma.

2. Objectifs de l'Etude

2.1. Objectif général

L'objectif général de notre étude est de déterminer le meilleur volume de sang total à utiliser sur papier buvard pour la quantification de la charge virale.

2.2. Objectifs spécifiques

De façon spécifique dans cette étude nous allons :

- Déterminer la charge virale plasmatique et de différents DBS avec le Nuclisens EasyQ HIV-1 V2.0 en saturant le papier buvard avec différents volumes de sang total (50, 75, 100 et 150 µl) ;
- Comparer sur une trentaine d'échantillons de sang total, la charge virale sur DBS des différents volumes prédéfinis avec du plasma (100µl);
- Déterminer le volume de spot de sang ayant une meilleure corrélation avec le plasma (100µl).

Chapitre II : Matériel et Méthodes

1. Type d'étude

Il s'agissait d'une étude prospective et évaluative, qui consistait à quantifier la charge virale des personnes infectées par le VIH à J₀ de traitement antirétroviral.

2. Cadre de l'étude

Notre étude a eu pour cadre le Laboratoire de Bactériologie-Virologie du CHU Aristide Le Dantec, plus précisément au sein de son unité de Biologie Moléculaire.

Ce laboratoire hospitalo-universitaire a pour vocation le diagnostic biologique des infections bactériennes et virales, la recherche et la formation dans les domaines de la bactériologie et de la virologie.

C'est un centre de référence des IST et un centre collaborateur de l'ONUSIDA.

Il est le siège du Réseau Africain de Recherche sur le SIDA (RARS) et abrite en son sein l'observatoire des résistances aux antirétroviraux et le programme de recherche sur les vaccins anti-VIH en Afrique.

Institution partenaire du WAPHIR (West African Plateform for HIV intervention Research), il est également le siège de la WANETAM (West African noE for TB, AIDS and Malaria).

Le laboratoire est subdivisé en 5 unités techniques et 3 unités de soutien (un service administratif et financier, un service de maintenance et de métrologie, informatique et gestion des données).

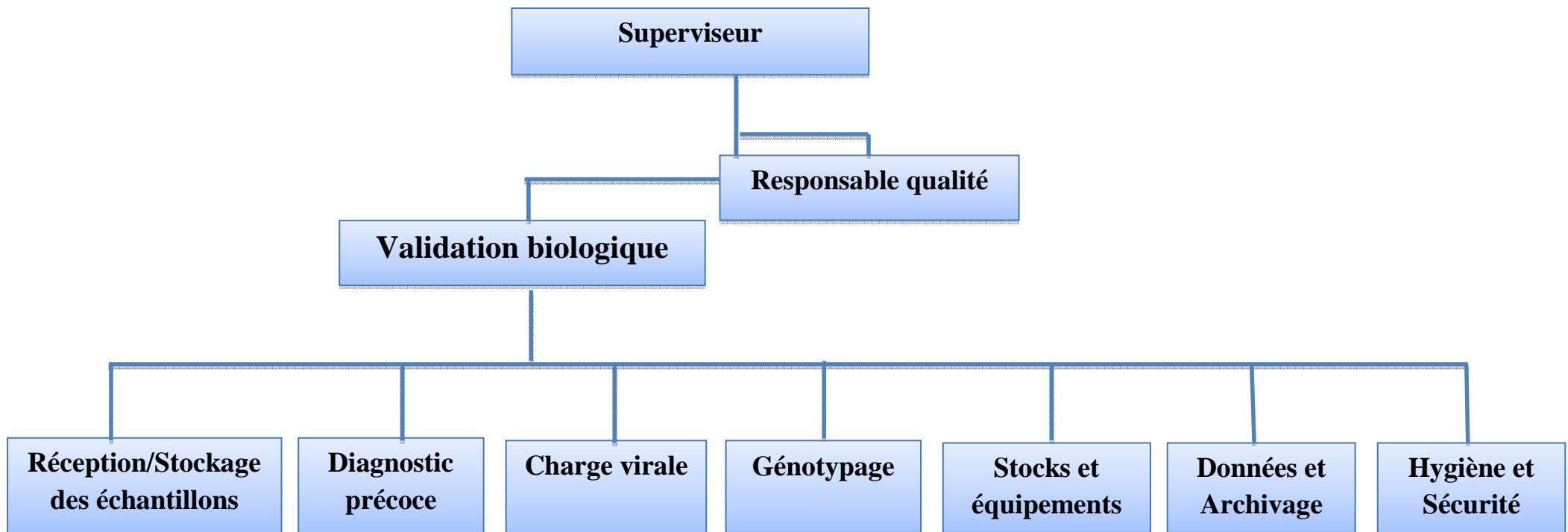
Les unités techniques sont :

- Unité de Bactériologie
- Unité de Virologie
- Unité de Biologie Moléculaire
- Unité d'Immunologie
- Unité d'essais et de recherches cliniques.

L'unité de Biologie Moléculaire créé en 1997, comporte 2 sections, la section Malaria et la section VIH.

La section VIH a pour missions le diagnostic moléculaire de l'infection à VIH et le suivi virologique des patients sous ARV dans le cadre de l'ISAARV, avec la détermination de

la charge virale plasmatique, la surveillance de la circulation de souches de VIH et la résistance acquise aux ARV des patients sous traitement. De même, l'unité s'occupe de recherches basées sur des études de cohortes, des essais thérapeutiques, le développement d'outils alternatifs de diagnostic et de suivi virologique des patients infectés par le VIH. Elle s'y intéresse également à la quantification de la charge virale des hépatites, le diagnostic moléculaire des IST à *Chamydia trachomatis / Neisseria gonorrhoeae* et le diagnostic précoce de l'infection chez les enfants nés de mères séropositives.



3. Echantillonnage

Notre étude a porté sur 31 échantillons de sang total de patients séropositifs, à J0 de TARV, provenant des sites de prise en charge des PVVIH de Dakar. Nous avons inclus dans notre étude, tout échantillon de 4ml de sang sur tube EDTA prélevé sur des patients J0, naïf de tout TARV, confirmés VIH-1 positif.

4. Matériel

4.1. Matériel d'usage général

- Hotte à flux laminaire (enceinte stérile de classe II) ;
- Micro pipettes de 10, 20, 200 et 1000µl ;
- Portoirs ;
- Agitateur à rouleaux avec action de balancement et de roulement pour assurer un mélange doux ;
- Embouts stériles avec et/ou sans filtre de 10, 20, 200 et 1000µl ;
- Pipette – Aide, Pipette 5ml et Pipette Pasteur ;
- Conteneur déchets à couvercle ;
- Cryotubes de 1,8 à 2 ml ;
- Micro tubes stériles de 1,5 ml et de 2 ml ;
- Bain – marie ;
- Agitateur de type vortex ;
- Centrifugeuse ;
- Chronomètre ;
- Gants jetables sans talc ;
- Tubes de 5 et 15 ml avec bouchons ;
- Sarrau ou blouse de laboratoire propre ;
- Essuie-tout ;
- Pissette d'éthanol 70% ;
- Burette graduée
- Pissette d'eau de javel (10% d'hypochlorite de sodium) ;
- Eau distillée ;
- Papier buvard : Whatman 903 (**Proteinsaver TM 903® Card**) ;

- Sachet de déssicant (sachet de sorbant MiniPax® de 2 grammes, MultiSorb Technologies) ;
- Congélateur – 80°C et réfrigérateur +4°C.

4.2. Réactifs et équipements pour la technologie Nuclisens EasyQ HIV-1 V 2.0

4.2.1. Extraction

Les équipements et réactifs utilisés pour la réaction d'extraction sont les suivants :

- Les tubes de lyse contenant 2ml de Lysis Buffer ;
- L'agitateur horizontal ;
- Les peignes et les navettes ;
- Le portoir des navettes ;
- Le vortex ;
- Les tampons d'extraction : Nuclisens EasyMAG Buffer 1, 2 et 3 ;
- La silice magnétique Nuclisens EasyMAG ;
- Le contrôle interne et le diluant Nuclisens EasyMAG ;
- L'automate Nuclisens EasyMAG.

4.2.2. Amplification et détection

Pour la réaction d'amplification – détection, les équipements et réactifs utilisés sont les suivants :

- Les barrettes avec les bouchons ;
 - Le portoir des barrettes ;
 - L'incubateur Nuclisens EasyQ ;
 - Le vortex ;
 - La centrifugeuse des mini barrettes ;
 - L'analyseur Nuclisens EasyQ ;
 - Les enzymes (EnzII) ;
 - Le diluant d'enzymes (Enzdil H) ;
 - Les amores (PRM H) ;
 - Le diluant d'amorce (PRMdil H).
- 
- Kit Nuclisens EasyQ HIV-1V 2.0

Les réactifs doivent être conservés entre 2 et 8°C.

5. Méthodologie de l'étude

5.1. Vérification de l'identification et attribution d'un numéro

A l'arrivée des prélèvements, le réceptionniste – archiviste du laboratoire ou alors le responsable de la séparation procède à une vérification de la conformité du bulletin de demande d'analyses ainsi que la conformité du prélèvement (sang prélevé sur tube EDTA, un minimum de 4 ml de sang par tube, 2 tubes de sang par patient du programme ISAARV).

Après vérification de la conformité du bulletin et du prélèvement, un code (numéro interne) unique est attribué. C'est ce code qui est utilisé du début du processus jusque la fin des analyses effectués pour chaque prélèvement.

5.2. Préparation des spots et conservation

Chaque carte de papier buvard (W-903) pour chaque patient à J0 est remplie avec les informations suivantes : le numéro d'identification interne, la date, le volume de sang de saturation (50, 75, 100, 150µl).

Pour chaque patient, 6 cartes de DBS sont préparées après homogénéisation du tube de sang. Sur la 1^{ère} carte de papier buvard, 50 µl de sang total sont déposés dans les 5 anneaux de la carte et sur la 2^{ème} carte, 75 µl de sang total sont également déposés dans les 5 anneaux. Pour les volumes de saturation de 100 et 150 µl, 2 cartes sont utilisés pour chaque volume et seules 3 anneaux sont saturés, espacés chacune d'un anneau vide. Ceci dû au fait que le dépôt avec ces volumes, déborde la surface de l'anneau.

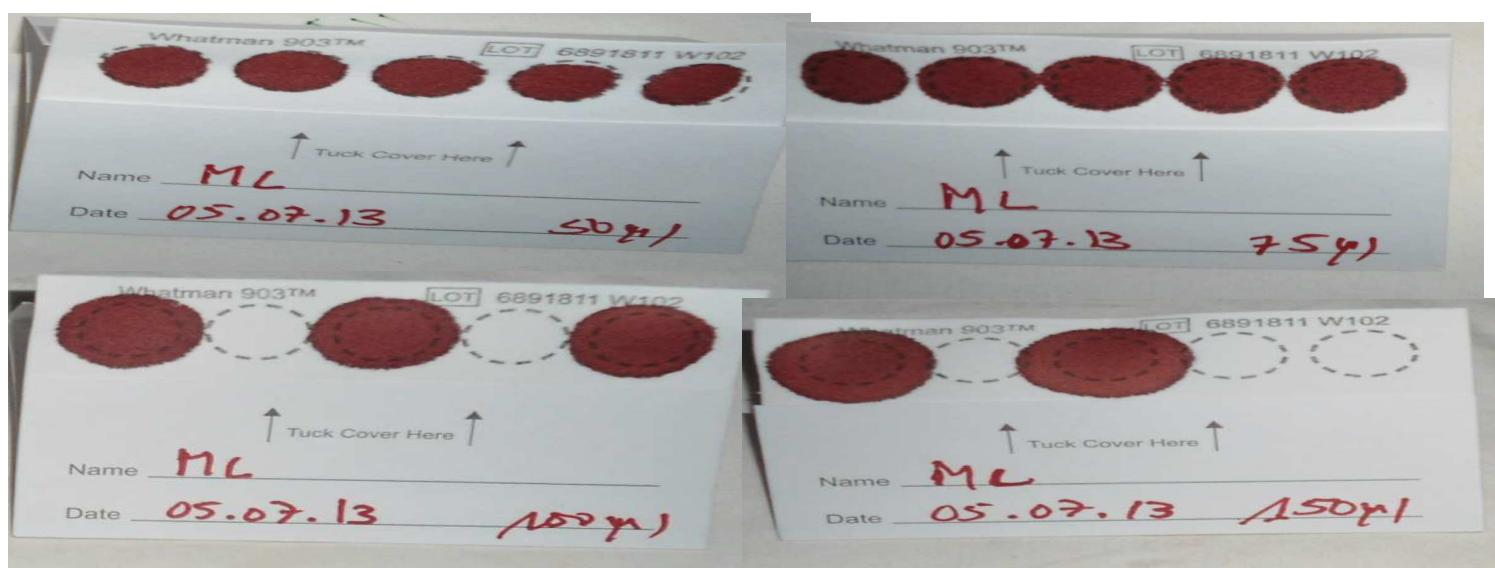


Figure 12 : Photographies des cartes de DBS avec les différents volumes déposés

Les spots ainsi réalisés sous la hotte sont séchés à température ambiante jusqu'au lendemain, puis sont emballés dans des sacs de glycine zippés contenant des sachets de déssicants et conservés à – 80°C jusqu'à leur utilisation.



Figure 13 : Photographie d'un sac zippé prêt pour la conservation ou pour l'envoi

5.3. Séparation lymphocytaire et conservation

Après confection des spots, le reliquat de sang total contenu dans le tube est centrifugé à 2500 tours / min pendant 10 minutes. Le plasma des échantillons ainsi obtenu est alors aliquoté (sous la hotte) dans les cryotubes de 2ml. Les aliquots de plasma sont conservés à – 80°C jusqu'à leur utilisation.

5.4. Découpe des DBS et lyse

A leur sortie du congélateur – 80°C, les cartes doivent être découpées et lysées dans l'heure.

➤ **Principe de la réaction de lyse**

La réaction se fait à l'aide du Tampon de lyse Nuclisens® Lysis Buffer (contenant principalement du thiocyanate, < 2% de Triton X-100, < 1% EDTA) qui est utilisé pour la libération totale des acides nucléiques des échantillons biologiques. Tous les acides nucléiques présents dans l'échantillon sont libérés suite à une lyse des particules virales ou matières cellulaires contenues dans l'échantillon. Les Rnases et les Dnases présentes dans l'échantillon seront désactivées. ⁽¹²⁾

➤ Mode opératoire

A l'aide d'un Puncheur 12 calibré certifié CE des laboratoires Biomérieux, 2 spots de chaque carte (de différents volumes) ont été découpés (les spots obtenus ont un diamètre de 12 mm) et placé dans les tubes de Lysis Buffer Nuclisens contenant 2ml de solution de lyse.

Les tubes Lysis Buffer de Nuclisens (conservation entre 2 – 30°C) sont préalablement incubés au bain marie à 37°C, afin de dissoudre d'éventuels cristaux de Guanidine formés. Pour chaque échantillon, la découpe se fait avec des cartes de volume croissant (50 à 150µl). Entre deux coupes de spots d'échantillons différents, le puncheur est décontaminé en découpant 2 à 3 fois du papier stérile.

Les tubes Lysis Buffer sont déposés sur un agitateur horizontal à rouleaux pendant 30 min, en prenant la précaution que les spots soient toujours en contact avec la solution de lyse. Cette étape permet la lyse des éléments cellulaires permettant ainsi la libération de l'ADN viral.



Figure 14 : Photographie des tubes de lyse sur l'agitateur horizontal

Après 30 min d'agitation horizontale, les tubes sont centrifugés à 1500 tours pendant 15 s, ceci en vue de faire descendre liquide au fond du tube.

Un embout (sans filtre) de 100 µl fixé sur l'embout avec filtre de 5 ml, permet transférer les lysats dans les navettes du Nuclisens EasyMAG, en évitant de pipeter les particules de papier, et en laissant un reliquat de ± 50 µl de lysat au fond du tube afin d'éviter de transférer la mousse.

Les lysats peuvent être conservés à – 80°C pour un délai maximal d'1 mois, ou pendant 14 jours à + 4°C au max ou bien à température ambiante pendant 24h, mais jamais à – 20°C car il en résulte une gélification de la solution de lyse qui gênera l'étape d'extraction.

5.5. Extraction – Amplification et détection par la technologie Nuclisens EasyQ HIV-1 V2.0

L'extraction du matériel génétique se fait grâce à l'automate de Nuclisens EasyMAG des laboratoires Biomérieux et l'amplification détection est faite avec l'analyseur EasyQ.

5.5.1. Extraction des acides nucléiques sur l'automate EasyMAG

➤ **Principe de la réaction d'extraction :**

La réaction d'extraction est faite par la chimie de Boom, qui est basée sur le pouvoir fixateur de la silice magnétique vis-à-vis des acides nucléiques. Cette réaction est réalisée grâce à une série de réactifs : la silice, le tampon de lavage 2, le tampon de lavage 3 et le tampon d'éluion.

Dans les conditions de salinité élevée, La silice magnétique fixe les acides nucléiques présents dans la solution de lyse. Elle a une capacité de fixation 20 supérieure à la silice ordinaire. Ces particules de silice agissent comme une phase solide et les composants étrangers aux acides nucléiques sont retirés après plusieurs étapes de lavage dans le Nuclisens EasyMAG ; enfin les acides nucléiques sont élués dans la phase solide.

A la fin de l'étape, un pur concentré d'ARN est obtenu au fond de la navette.

Extraction Principle

- A. During incubation of the lysed samples, all the target nucleic acid is captured by magnetic silica particles.
- B. The NucliSENS easyMAG magnetic device attracts all the magnetic silica, enabling the system to purify the nucleic acids through several washing steps.
- C. The heating step releases the nucleic acids from the silica.
- D. At the final step, the magnetic silica particles are separated from the eluate by the magnetic device.

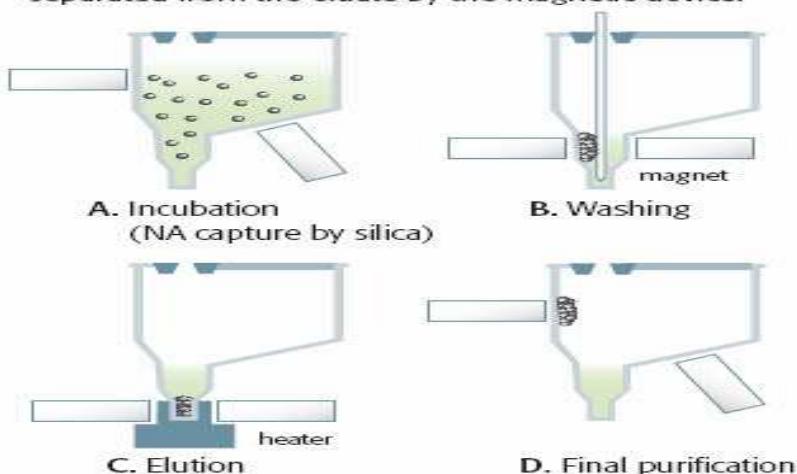


Figure 15 : Schéma de l'extraction sur Nuclisens EasyMAG

➤ Mode opératoire

Après maintenance de l'automate, une liste de la série de travail est créé avec les numéros des échantillons au niveau de l'automate Nuclisens EasyMAG, en sélectionnant comme protocole d'extraction HIV-1 2.0, en indiquant le type de prélèvement (primaire ou lysé), la matrice de l'échantillon (plasma ou sang total) et le volume de l'éluat (25µl).

Les peignes et les navettes sont placés dans l'appareil, puis 2 ml de solution de lysat sont déposés (ceci pour chaque échantillon de DBS) dans chaque puit de la navette. Par ailleurs, 100 µl de plasma (pour chaque échantillon) sont déposés dans le puit de la navette. La lyse du plasma est réalisée par l'automate Nuclisens EasyMAG en 10 min.

Après ajout de 100 µl du mix préparé extemporanément (contrôle interne + silice) dans chaque puit, l'appareil procède à l'extraction du matériel génétique. Cette étape dure environ 40 min.

Dans les 5min suivant la fin de l'extraction, les extraits doivent être transférés dans les barrettes EasyQ, car la silice présente sur la paroi du puit risque de se désagréger et de tomber dans l'extrait ce qui inhibera la réaction d'amplification.

Ce sont 15 µl d'extrait qui sont déposés dans ces barrettes en vérifiant l'absence de bulles d'air et le même niveau de volume de solution pour chaque puit de la barrette.

5.5.2. Amplification et détection par la technologie Nuclisens EasyQ HIV-1 V2.0

➤ Principe de la réaction d'amplification

La réaction d'amplification par NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) consiste en une amplification d'acide nucléique combinée à une étape de détection simultanée.

L'amplification des acides nucléiques sur Nuclisens EasyQ® HIV-1 v2.0 utilise des amorces qui sont spécifiques des séquences détectées de l'ARN du VIH-1 de type sauvage (WT) et de l'ARN du calibrateur synthétique de Nuclisens EasyQ® HIV-1 v2.0. Cet ARN du calibrateur ne diffère de l'ARN du VIH-1 WT que par une petite séquence nucléotidique qui permet les mêmes cinétiques d'amplification. Tout ARN du VIH-1 WT présent dans les acides nucléiques élués est co-amplifié avec le calibrateur interne. Les autres séquences d'acides nucléiques ne seront pas amplifiées. L'amplification NASBA® est basée sur un processus répété d'accrochage d'amorce, une formation d'ADN double brin contenant un promoteur T7 et une transcription facilitée par l'ARN polymérase T7 de plusieurs copies antisens des séquences cibles d'ARN WT et d'ARN calibrateur (amplicons).⁽³⁰⁾

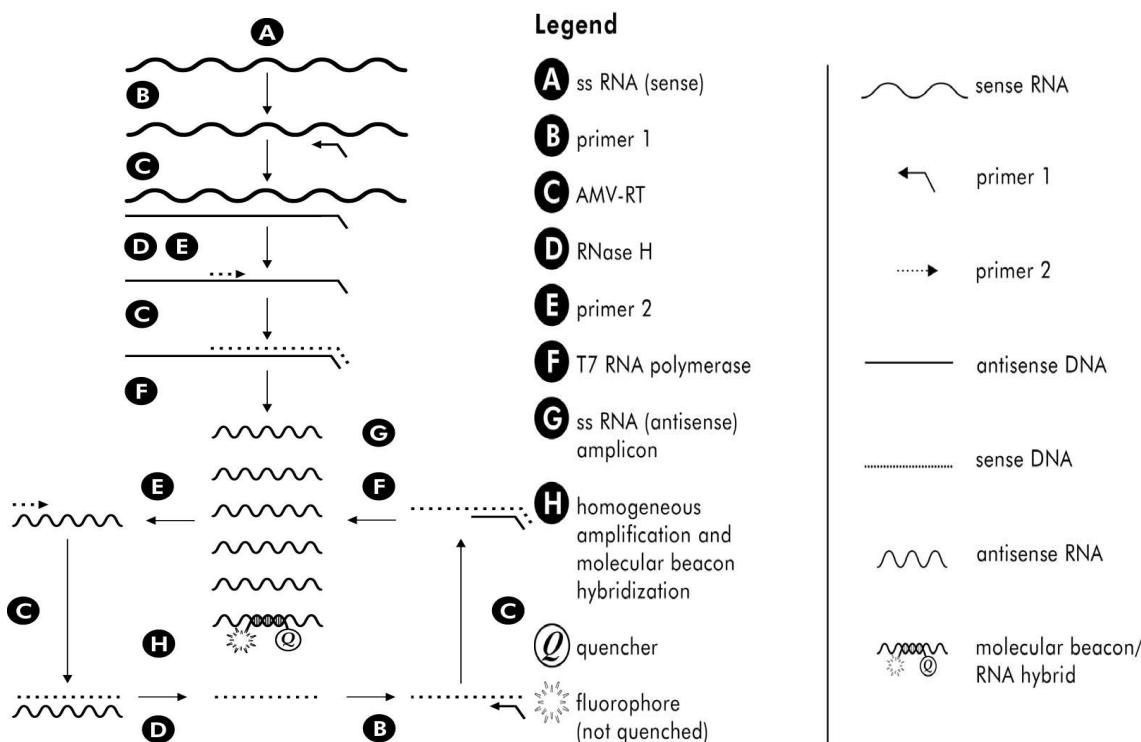


Figure 16 : Principe de la réaction d'amplification par NASBA.

➤ Principe de la réaction de détection

Le processus de détection du test Nuclisens EasyQ® HIV-1 v2.0 utilise des balises moléculaires spécifiques de la cible.

Une balise moléculaire est un oligonucléotide d'ADN comprenant une séquence nucléotidique spécifique qui reconnaît une séquence d'ARN cible particulière, couplée à un fluorophore et à un quencher. En l'absence d'ARN complémentaire, la balise moléculaire restera dans une structure interne en épingle à cheveu ; le quencher reste alors à proximité du fluorophore. La conséquence sera l'extinction de la fluorescence de la balise moléculaire. En présence d'une séquence « cible » complémentaire, la balise s'ouvre et émet une fluorescence, ce qui indique la présence de la séquence cible.^(118, 119)

L'utilisation de deux fluorophores différentes permet de suivre simultanément la synthèse de la cible WT et de l'ARN du calibrateur. L'analyse cinétique des signaux fluorescents permet de dégager les vitesses de transcription de la cible WT et de l'ARN du calibrateur. Elle permet de déduire la quantité d'ARN du VIH-1 dans l'échantillon de plasma/DBS (prélèvements de sang total EDTA) de départ.^(35, 112, 126) La charge virale peut alors être mesurée à l'aide d'un algorithme de réduction des données dans le logiciel de test Nuclisens EasyQ® HIV-1 v2.0⁽¹²²⁾

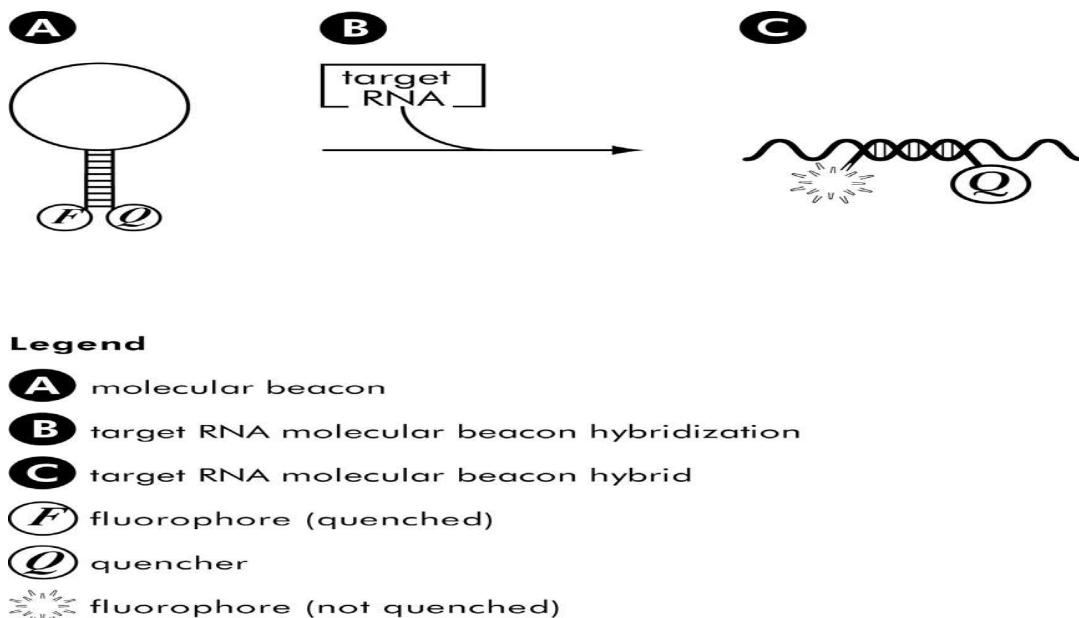


Figure 17 : Principe de la détection par les balises moléculaires

➤ Mode opératoire

Sur l'analyseur EasyQ, une série de travail avec les numéros des échantillons est préparée en choisissant le protocole de dosage HIV-1 2.0, en indiquant le volume de l'échantillon (100 µl) et la matrice de l'échantillon (plasma ou DBS).

La reconstitution de l'enzyme est réalisée en ajoutant 45 µl de diluant enzyme à l'enzyme lyophilisée (un lyophilisat d'enzyme correspond à 8 échantillons) puis laisser reposer 15 min avant utilisation.

La préparation de la solution d'amorce se fait en ajoutant 180 µl de diluant d'amorce aux amorces lyophilisées (2 dans chaque tube) en mélangeant immédiatement au vortex jusqu'à obtention d'une solution claire (ne pas utiliser une solution qui contient un précipité). La solution doit être utilisée dans les 30 min. Chaque tube d'amorces correspond à l'amplification de 8 échantillons.

20 µl de solutions d'amorces reconstituée sont déposés dans chaque puit de la barrette qui est sur un portoir dans l'incubateur Nuclisens EasyQ®, qui est ensuite recouverte d'un couvercle et démarrage du programme (2 min à 65°C, 2min à 41°C).

Après les 15 min d'attente pour l'enzyme reconstituée, 5 µl de la solution enzymatique sont déposés dans chaque bouchon.

A l'issue de la dernière étape d'incubation (2 min à 41°C), les barrettes sont fermées avec les bouchons (contenant la solution enzymatique) à l'aide d'un accessoire de fermeture puis les barrettes sont identifiées de façon unique.

Le contenu des barrettes fermées est homogénéisé en fouettant les barrettes, puis centrifugation pendant 2 secondes dans la centrifugeuse mini barrettes.

Les portoirs de barrettes sont ensuite chargées dans l'analyseur Nuclisens EasyQ® avant la mise en marche de la réaction d'amplification – détection.

La réaction d'amplification basée sur la technologie NASBA qui cible la région du gène **gag** dure une heure de temps. A la fin de la réaction, les résultats s'affichent et il est possible de vérifier l'absence d'erreur (No Amplification, Poor Amplification, insufficient liquid etc.). Les résultats de la série seront exportés sur Microsoft Excel pour exploitation statistique des résultats.

6. Analyse statistique des résultats

La comparaison des résultats a été faite après transformation des valeurs de charge virale en log.

Le logiciel Microsoft Excel 2010, a permis de faire la conversion des résultats de la charge virale en valeur logarithmique décimale, ainsi que le calcul des différences de log.

Le logiciel MethVal a permis d'obtenir les tracés de la droite de régression et les analyses de concordance entre les valeurs des charges virales du plasma-DBS et entre différents prélèvements DBS.

La corrélation ou la régression linéaire consiste en présence de deux variables quantitatives, à tester l'hypothèse de l'existence d'une relation de proportionnalité entre elles. Divers types de renseignements sont fournis par la régression linéaire. En premier lieu, le coefficient r de Pearson évalue le degré de linéarité de la relation testée, son carré (R^2) représentant le pourcentage de variabilité expliquée par le modèle linéaire, plus la valeur du r est proche de 1 plus les 2 techniques sont corrélées. La pente et l'ordonnée à l'origine de la droite sont fournies par le calcul de la meilleure droite possible (selon la méthode des moindres carrés), passant au sein du nuage de points. Ces caractéristiques de la droite sont très utiles pour prédire, si la technique à tester s'avère valable.⁽⁴⁸⁾

La concordance de Bland et Altman consiste à apprécier l'écart observé (biais) entre les valeurs obtenues par une technique de référence par rapport à une technique à tester et les limites de concordance qui représentent les écarts des valeurs d'une technique par rapport à l'autre.

La concordance permet d'apprécier l'écart observé entre les 2 valeurs obtenues pour la mesure et d'en déduire, sur l'ensemble de la population observée, le biais, la précision, et les limites de l'intervalle de confiance à 95% afin de statuer sur la concordance des 2 séries de valeurs.

Les limites de concordance correspondent à un biais +/- 2 Ecart-Type (ou déviation standard) qui représente la moyenne de l'écart systématique d'une série de valeurs par rapport à l'autre. standard) et entre lesquelles se trouvent 95% des valeurs de différences.

Le principe de la méthode de Bland et Altman consiste à réaliser un graphe étudiant en ordonnée la différence entre les valeurs obtenues par les deux techniques A et B (soit $A - B$) et en abscisse la moyenne des valeurs obtenues par ces deux techniques, soit $(A + B)/2$. Plus la valeur du biais tend vers zéro, plus la concordance est meilleure.⁽⁴⁸⁾

TROISIEME PARTIE : EXPLOITATION DES RESULTATS

Chapitre I : Résultats

1. Résultats de la charge virale plasmatique

Notre étude évaluative a porté sur 31 échantillons de patients naïfs de traitement antirétroviral, ceci afin d'avoir des valeurs de charge virale élevées, qui permettraient une analyse statistique plus aisée.

Les valeurs de charge virale détectables variaient entre 670 et 2 700 000 copies/ml soit, converties en valeurs logarithmiques, entre 2,83 log et 6,43 log. Quatorze échantillons avaient une CV très élevée ($> 5 \text{ log}$) et 11 avec une CV élevée (entre 4 et 5 log).

Pour faciliter les analyses et se conformer à l'interprétation classique des résultats de charge virale, nous les avons classés en valeur faible, moyenne, élevée et très élevée. Ainsi les 31 échantillons se répartissent comme présenté dans le tableau I suivant.

Tableau I : Répartition des échantillons en fonction des valeurs de CVP

Classification des CV	Intervalles de valeurs (en copies/ml)	Intervalles de valeurs (en log)	N
Faible	100 – 1000	2 – 3 log	2
Moyenne	1000 – 10 000	3 – 4 log	4
Elevée	10 000 – 100 000	4 – 5 log	11
Très élevée	$> 100 000$	$> 5 \text{ log}$	14
Total			31

2. Comparaison globale des valeurs de CVP avec les DBS

La comparaison des valeurs de charges virale plasmatique des différents échantillons de DBS a été réalisée en calculant leur différence de log avec le plasma.

Globalement quel que soit le volume de sang déposé, 12 échantillons ont présenté une discordance entre plasma et DBS avec une différence de log comprise entre 0.51 et 1. Parmi ces 12 échantillons, 6 ne sont discordants que pour un seul volume de DBS dont 3 pour les DBS 150, 4 sont discordants pour plus de 2 volumes et 2 sont discordants pour plus de 3 volumes de sang déposé sur carte (voir tableau en annexe).

Le résumé du tableau global des résultats est présenté dans le tableau II ci-dessous.

Tableau II : Différences de log entre plasma et les différents volumes sur DBS

Différence de log	$\Delta\log \text{Pl-DBS_50}$	$\Delta\log \text{Pl-DBS_75}$	$\Delta\log \text{Pl-DBS_100}$	$\Delta\log \text{Pl-DBS_150}$
$\Delta\log \leq 0,5$	25	26	27	25
$0,5 < \Delta\log \leq 1$	6	5	4	6

Comme le montre le tableau pour chacun des volumes de sang déposé sur les cartes, la majorité des échantillons (entre 25 et 27) présente des résultats concordants avec une différence de log en valeur absolue inférieure à 0,5 c'est-à-dire non significative.

Le nombre d'échantillons discordants ($\Delta\log > 0,5$ en valeur absolue) ne varie pas beaucoup (entre 4 et 6) selon le volume de sang déposé :

- ✓ 6 échantillons sur 31 (19,35%) pour la valeur du $\Delta\log$ entre le plasma et DBS_50
- ✓ 5 échantillons sur 31 (16,13%) pour la valeur du $\Delta\log$ entre le plasma et DBS_75
- ✓ 4 échantillons sur 31 (12,9%) pour la valeur du $\Delta\log$ entre le plasma et DBS_100
- ✓ 6 échantillons sur 31 (19,35%) pour la valeur du $\Delta\log$ entre le plasma et DBS_150.

3. Analyse des discordances plasma DBS vs en fonction des valeurs de CVP

Les échantillons présentant des discordances ont une charge virale plasmatique qui varie entre 670 et 750 000 copies/ml.

Tableau III : Répartition des échantillons en fonction des $\Delta\log$ Plasma vs DBS en valeur absolue

CV en log	$\Delta\log \text{Pl-DBS_50}$		$\Delta\log \text{Pl-DBS_75}$		$\Delta\log \text{Pl-DBS_100}$		$\Delta\log \text{Pl-DBS_150}$	
	$\leq 0,5 \text{ log}$	$> 0,5 \text{ log}$	$\leq 0,5 \text{ log}$	$> 0,5 \text{ log}$	$\leq 0,5 \text{ log}$	$> 0,5 \text{ log}$	$\leq 0,5 \text{ log}$	$> 0,5 \text{ log}$
2 – 3 log	2	0	2	0	2	0	1	1
3 – 4 log	4	0	4	0	4	0	4	0
4 – 5 log	8	3	7	4	7	4	8	3
>5 log	11	3	13	1	14	0	12	2

Nous observons que les discordances sont notées essentiellement avec des échantillons dont les valeurs sont supérieures à 4 log. Seul 1 échantillon de charge virale plasmatique en dessous de 4 log (670 copies/ml) présente une discordance; celle-ci est observée uniquement pour un dépôt de 150 μ l de sang sur carte.

Pour tous les 12 échantillons correspondant à 21 discordances vis-à-vis du plasma, les valeurs des CVP sont supérieures à celles obtenues avec les différents volumes de DBS.

4. Droite de régression linéaire et concordance plasma vs DBS

4.1. Régression linéaire et concordance Plasma vs DBS_50

L'analyse de la droite de régression linéaire entre les valeurs de charge virale de 100 μ l de plasma et 2 spots de 50 μ l de sang déposés sur carte a donné la droite de régression suivante avec un coefficient de corrélation linéaire **R= 0,955 et une pente à 1.013**.

Le graphe de Bland-Altman qui compare les valeurs de DBS_50 à 100 μ l de plasma a donné un biais négatif mais faible de **-0,24 [- 0,346 à 0,135]** avec 4 échantillons sur les 31 soit 12,9% qui sortent de l'intervalle de confiance (95%) en dessous de la limite inférieure. De plus, la majorité des échantillons sont concentrés en dessous de la ligne basale montrant une légère sous-estimation de la charge avec le DBS_50.

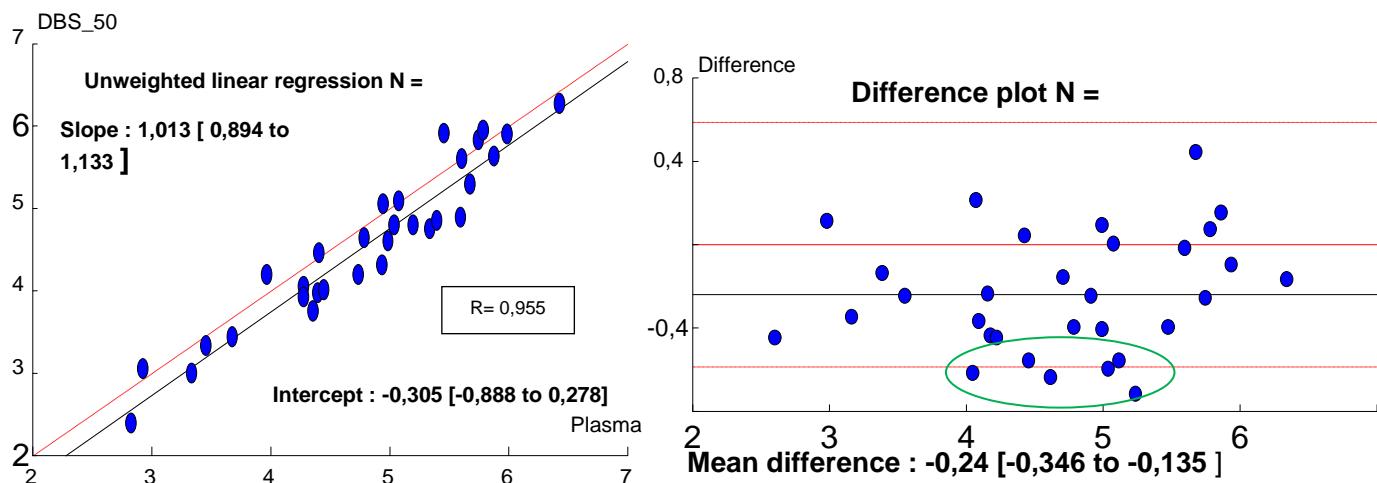


Figure 18 : Droite Régression et Bland-Altman Plasma vs DBS_50

4.2. Régression linéaire et concordance Plasma vs DBS_75

L'analyse de la droite de régression linéaire entre les valeurs de charge virale de 100 μ l de plasma et 2 spots de 75 μ l de sang déposés sur carte a donné la droite de régression suivante avec une bonne corrélation avec un coefficient **R=0,956 et une pente à 1.000**.

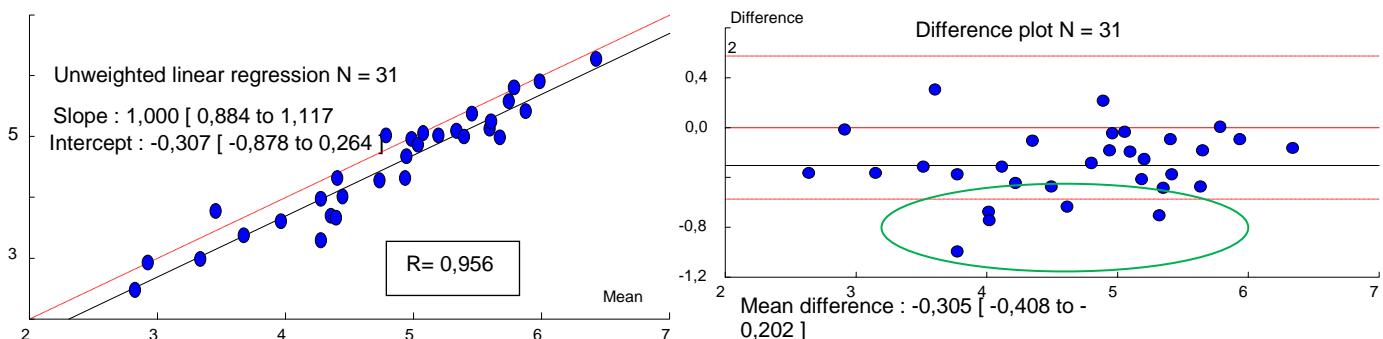


Figure 19 : Droite de régression et Bland-Altman Plasma vs DBS_75

Le graphe de Bland-Altman qui compare les valeurs de DBS_75 à 100 μ L de plasma a donné un biais négatif mais faible de **-0,305 (-0,878 à 0,264)** avec 5 échantillons sur les 31 soit 16.13% qui sortent de l'intervalle de confiance (95%) en dessous de la limite inférieure. De plus, la majorité des échantillons sont concentrés en dessous de la ligne basale montrant une légère sous-estimation de la charge avec le DBS_75.

4.3. Régression linéaire et concordance Plasma vs DBS_100

L'analyse de la droite de régression linéaire entre les valeurs de charge virale de 100 μ L de plasma et 2 spots de 100 μ L de sang déposés sur carte a donné la droite de régression suivante avec une bonne corrélation avec un coefficient **R=0,968 et une pente à 1,017**.

Le graphe de Bland-Altman qui compare les valeurs de DBS_100 à 100 μ L de plasma a donné un biais négatif mais faible de **-0,254 (-0,343 à 0,165)** avec 4 échantillons sur les 31 soit 12,9% qui sortent de l'intervalle de confiance (95%) en dessous de la limite inférieure. De plus, la majorité des échantillons sont concentrés en dessous de la ligne basale montrant une légère sous-estimation de la charge avec le DBS_100.

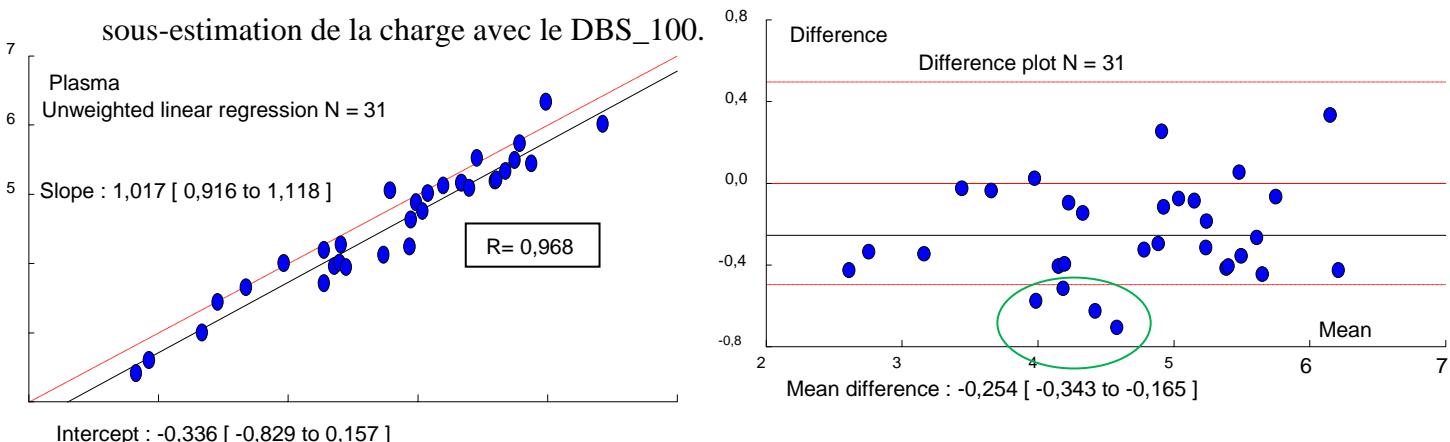


Figure 20 : Droite de régression et Bland-Altman Plasma vs DBS_100

4.4. Régression linéaire et concordance Plasma vs DBS_150

L'analyse de la droite de régression linéaire entre les valeurs de charge virale de 100 μ l de plasma et 2 spots de 150 μ l de sang déposés sur carte a donné la droite de régression suivante avec une bonne corrélation avec un coefficient **R=0,952 et une pente à 1.032**

Le graphe de Bland-Altman qui compare les valeurs de DBS_150 à 100 μ L de plasma a donné un biais négatif mais faible de **-0,268 (-0,379 à 0,157)** avec 4 échantillons sur les 31 soit 12,9% qui sortent de l'intervalle de confiance (95%) en dessous de la limite inférieure. De plus, la majorité des échantillons sont concentrés en dessous de la ligne basale montrant une légère sous-estimation de la charge avec le DBS_100.

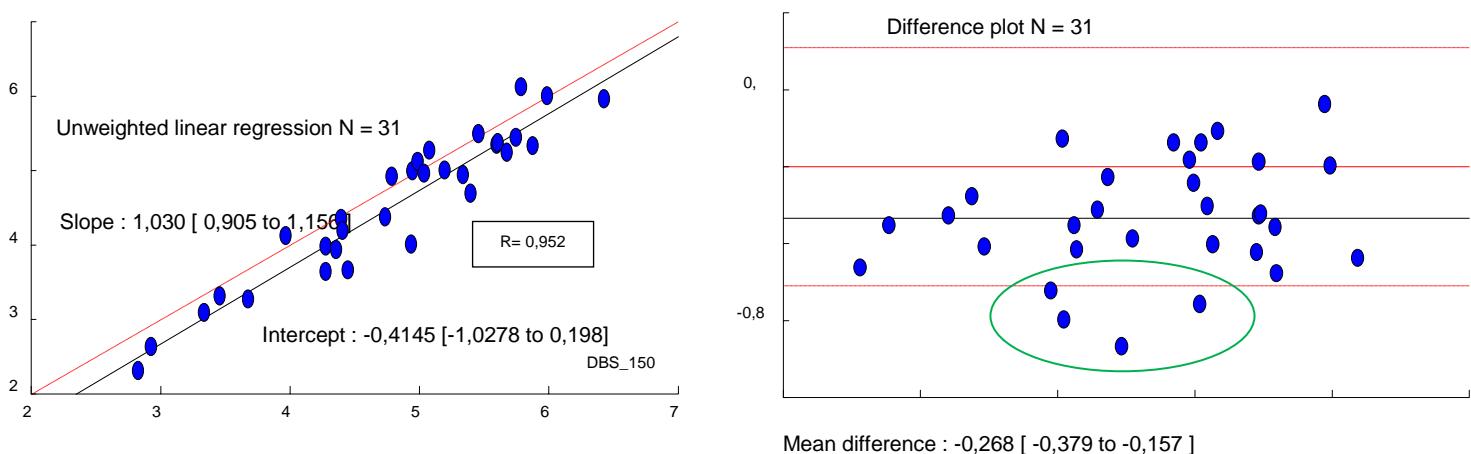


Figure 21 : Droite de régression et Bland-Altman Plasma vs DBS_150

5. Comparaison des valeurs de charge virale obtenues sur DBS

Globalement quel que soit le volume de sang déposé considéré, 6 discordances correspondant à 5 échantillons ont été notées entre les différents volumes de DBS avec une différence de log en valeur absolue comprise entre 0,69 et 0,76. Parmi ces 5 échantillons, 1 seul présentait une discordance pour 2 volumes (DBS_50/75 et DBS_75/150) soit un total de 6 échantillons discordants (voir tableau en annexe 1).

Le résumé du tableau global des résultats des comparaisons entre différents volumes de DBS est présenté dans le tableau IV ci-dessous.

Tableau IV : Répartition des différences de log en valeur absolu entre les DBS en fonction de leur concordance

Différence de log	$\Delta\log$ 50-75	$\Delta\log$ 50-100	$\Delta\log$ 50-150	$\Delta\log$ 75-100	$\Delta\log$ 75-150	$\Delta\log$ 100-150
$\Delta\log \leq 0,5$	28	31	30	31	29	31
$0,5 < \Delta\log \leq 1$	3	0	1	0	2	0

Les discordances notées concernent les volumes de DBS_50 vs DBS_75 (n=3), DBS_50 vs DBS_150 (n=1) et DBS_75 vs DBS_150 (n=2). Aucune discordance n'a été notée pour les DBS_50 vs 100, DBS_75 vs 100 et DBS_100 vs 150.

6. Analyse des discordances DBS vs DBS en fonction des valeurs de CVP

Les discordances observées se répartissent entre les différentes valeurs de charge virale à l'exception des valeurs faibles (comprises entre 2 et 3 log) avec 2 échantillons discordants entre 3 et 4 log, 3 discordants entre 4 et 5 log et 1 échantillon discordant au-delà de 5log.

Tableau V : Répartition des DBS présentant des discordances en fonction des valeurs log de CVP

CV en log	$\Delta\log$ DBS 50-75		$\Delta\log$ DBS 50-150		$\Delta\log$ DBS 75-150	
	$\leq 0,5$ log	$> 0,5$ log	$\leq 0,5$ log	$> 0,5$ log	$\leq 0,5$ log	$> 0,5$ log
2 – 3log	2	0	2	0	2	0
3 – 4log	3	1	4	0	3	1
4 – 5log	10	1	10	1	10	1
>5 log	12	1	14	0	14	0

7. Droite de régression linéaire et concordance entre les prélèvements DBS

7.1. Régression linéaire et concordance DBS_50 vs DBS_75

L'analyse de la droite de régression linéaire entre les valeurs de charge virale des spots de 50 µl vs 75 µl de sang déposés sur carte montre sur la droite de régression une dispersion assez importante de quelques points ; ce qui donne un coefficient de corrélation **R=0,956** avec une pente à **0,943**.

Le graphe de Bland-Altman qui compare les valeurs de DBS 50 vs DBS 75 a donné un biais négatif mais très faible de **-0,0645 (-0,169 à 0,0402)** avec 1 échantillon sur les 31 soit 3,25% qui sortent de l'intervalle de confiance en dessous de la limite inférieure. La valeur négative du biais témoigne d'une sous-estimation par le DBS 75 mais celle-ci est extrêmement faible.

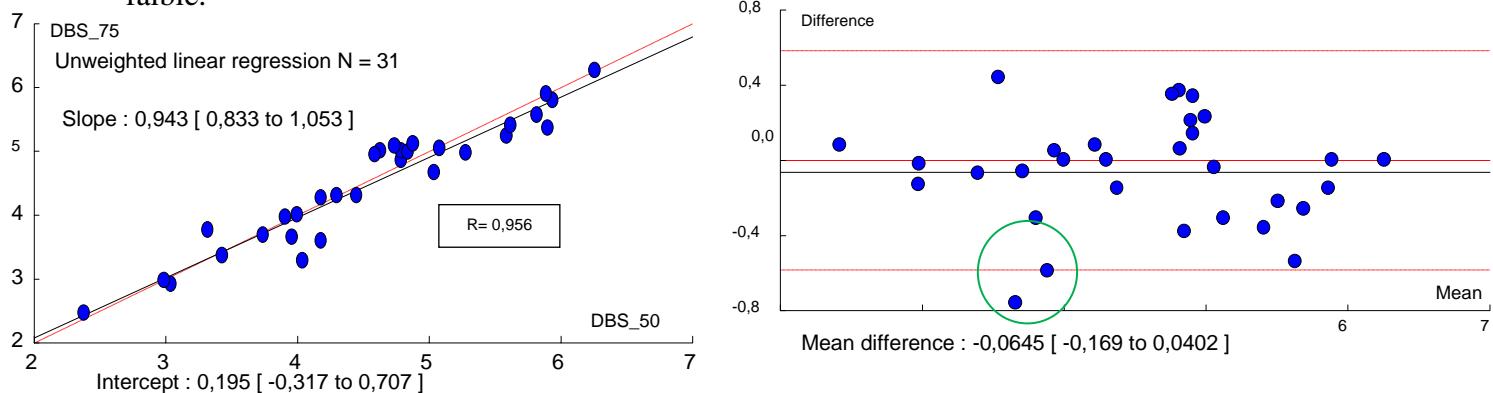


Figure 22 : Droite de régression et Bland-Altman DBS_50 vs DBS_75

7.2. Régression linéaire et concordance DBS_50 vs DBS_100

L'analyse de la droite de régression linéaire entre les valeurs de charge virale des spots de 50 µl vs 100 µl de sang déposés sur carte montre une bonne corrélation avec un coefficient de **R=0,961 avec une pente à 0,952**.

Le graphe de Bland-Altman correspondant a donné un biais négatif mais très faible de **-0,0139 (-0,113 à 0,0851)** avec aucun échantillon en dehors de l'intervalle de confiance.

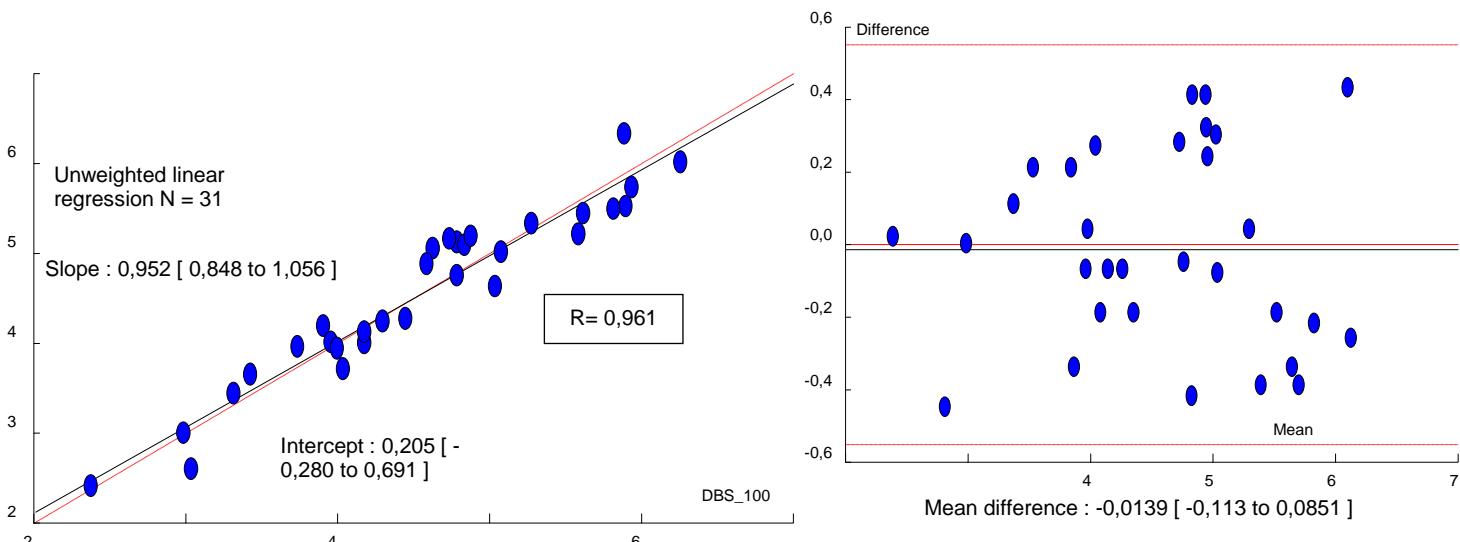


Figure 23 : Droite de régression et Bland-Altman DBS_50 vs DBS_100

7.3 Droite de régression linéaire et concordance DBS_50 vs DBS_150

L'analyse de la droite de régression linéaire entre les valeurs de charge virale des spots de 50 µl vs 150 µl de sang déposés sur carte montre une bonne corrélation avec un coefficient de **R=0,962 avec une pente à 0,981**.

Le graphe de Bland-Altman qui compare les valeurs de DBS 50 vs DBS 150 a donné un biais négatif mais très faible **de 0,0369 (-0.0615 à 0.135)** avec 1 échantillon sur les 31 soit 3,25% qui sortent de l'intervalle de confiance en dessous de la limite inférieure. La valeur du biais est positive témoignant d'une très légère sur-estimation par le DBS.

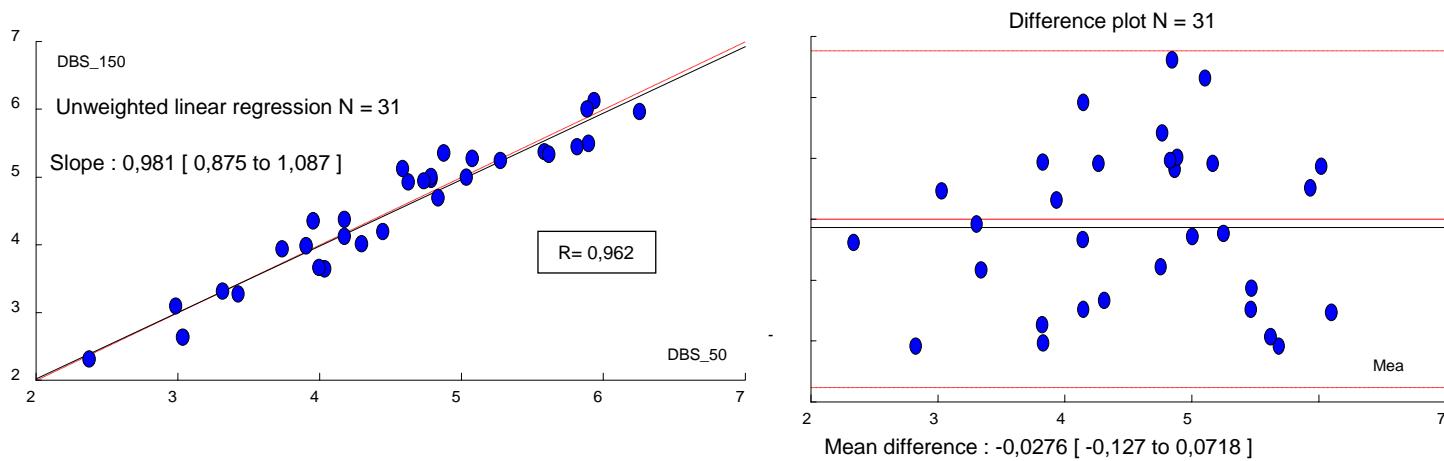


Figure 24 : Droite de régression et Bland-Altman DBS_50 vs DBS_150

7.4. Régression linéaire et concordance DBS 75 vs DBS 100

L'analyse de la droite de régression linéaire entre les valeurs de charge virale des spots de 75 µl vs 100 µl de sang déposés sur carte montre une bonne corrélation avec un coefficient de **R=0,977 avec une pente à 0,981**.

Le graphe de Bland-Altman correspondant a donné un biais négatif mais très faible de **0,0506 (-0.0255 à 0.127)** avec 2 échantillons à la limite supérieure de l'intervalle de confiance.

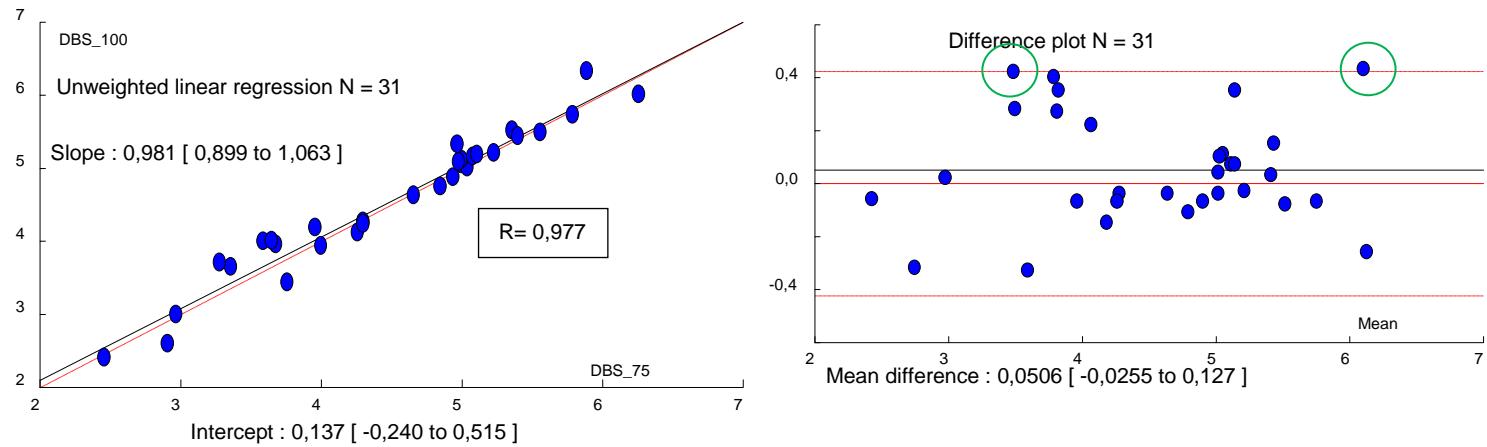


Figure 25 : Droite de régression et Bland-Altman DBS_75 vs DBS_100

7.5. Droite de régression linéaire DBS 75 vs DBS 150

L'analyse de la droite de régression linéaire entre les valeurs de charge virale des spots de 75 µl vs 150 µl de sang déposés sur carte montre une bonne corrélation avec un coefficient de **R=0,963 avec une pente à 0,995**.

Le graphe de Bland-Altman qui compare les valeurs de DBS_75 vs DBS_150 a donné un biais négatif mais très faible **de 0,0369 (-0,0615 à 0,135)** avec 1 échantillon sur les 31 soit 3,25% qui sortent de l'intervalle de confiance en dessus de la limite supérieure. La valeur du biais est positive témoignant d'une très légère sur-estimation par le DBS_150.

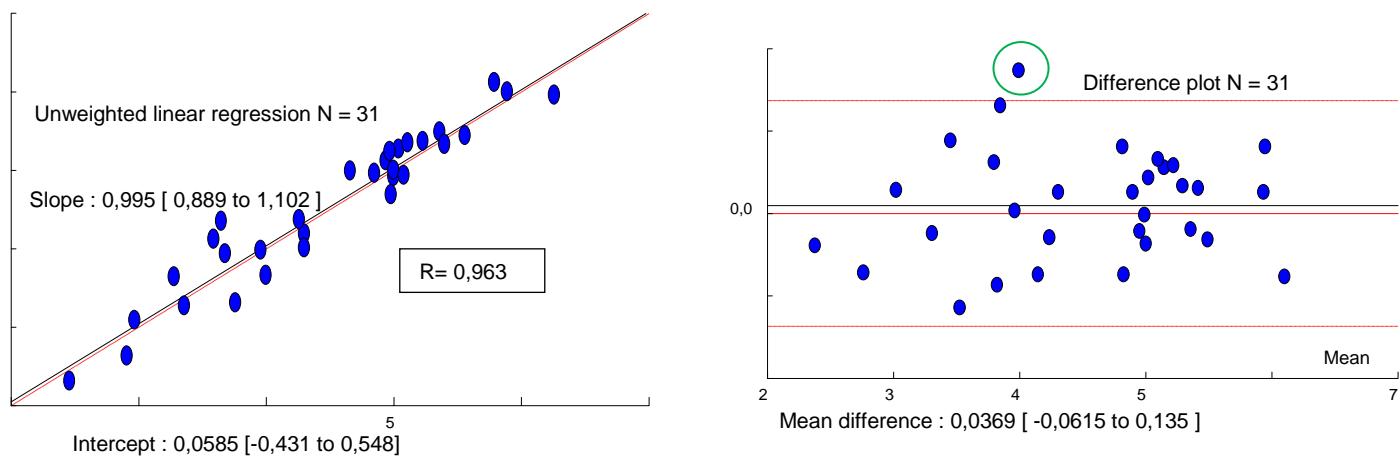


Figure 26 : Droite de régression DBS_75 vs DBS_150

7.6. Ligne de régression linéaire DBS_100 vs DBS_150

L'analyse de la droite de régression linéaire entre les valeurs de charge virale des spots de 100 µl vs 150 µl de sang déposés sur carte montre une bonne corrélation avec un coefficient de **R=0,975 avec une pente à 1.004**.

Le graphe de Bland-Altman correspondant a donné un biais négatif mais très faible de **-0,137 (-0,0938 à 0,0664)** avec aucun échantillon en dehors de l'intervalle de confiance.

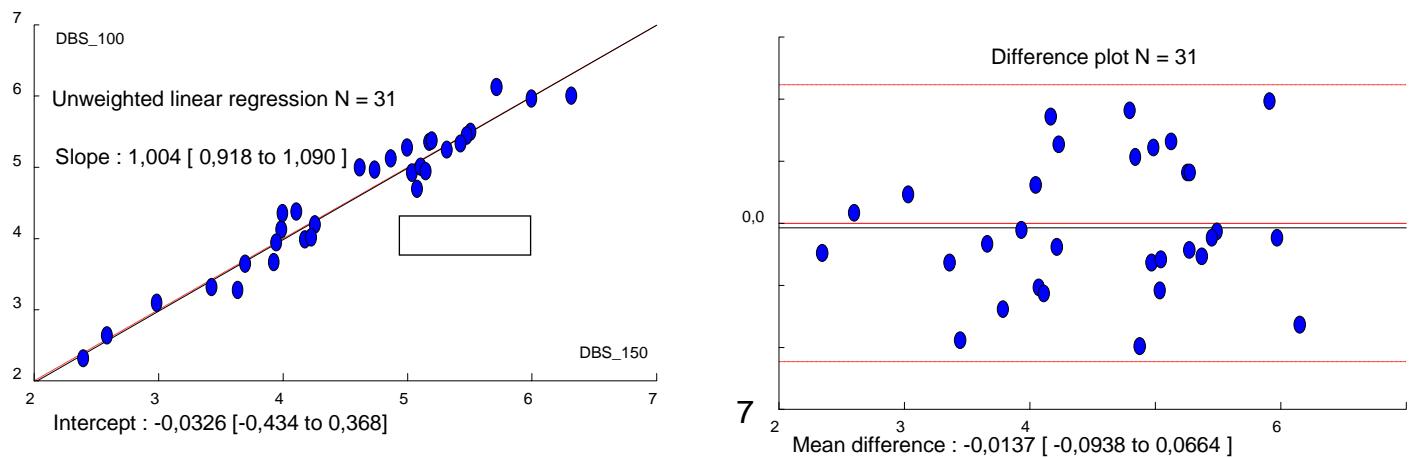


Figure 27 : Droite de régression et Bland-Altman DBS_100 vs DBS_150

Discussion

1. Utilisation du papier buvard et de la technologie NucliSENS

Le suivi virologique des PVVIH en zone décentralisée dans les pays à ressources limitées fait face à de nombreuses difficultés liées entre autres au nombre limité d'infrastructures adéquates et à des problèmes de logistique. Parmi ces contraintes logistiques on peut citer :

- la difficulté de conservation du plasma du fait d'un manque de source d'énergie fiable et de réfrigération
- la labilité de l'ARN viral qui impose une séparation lymphocytaire et une conservation du plasma dans les 6 heures qui suivent le prélèvement.

Depuis la première validation de l'utilisation du papier buvard pour la quantification de la charge virale avec une technique commerciale (NucliSENS EasyQ v1.2) décrite par **Kane et coll. 2008**, de nombreux travaux ont rapporté l'utilisation des DBS aussi bien pour la charge virale que le génotypage de résistance.⁽⁶⁰⁾

Le papier Whatman 903 que nous avons testé est celui qui est le plus couramment utilisé et les travaux récents de **ROTTINGHAUS, E. et coll.** ce qui confirme sa grande qualité en comparaison avec 2 autres types de papier buvard commercialisés (Ahlstrom Grade A-226 et Munktell TFN) pour la réalisation des DBS en vue de la charge virale. Cependant pour le test de génotypage, les DBS réalisés sur le papier filtre M-TFN a une plus grande efficacité et apparaît plus sensible dans la détection des mutations majeures de résistance du VIH.⁽¹⁰⁰⁾

La technique de NucliSENS sur DBS version 1.2 a fait l'objet d'une évaluation en zone rurale en Tanzanie par **Johannessen, A. et coll.** qui avait montré une bonne performance sur DBS pour le suivi des patients recevant un TARV. Cependant sa sensibilité est réduite lorsque la charge virale était faible.⁽⁵⁷⁾

Mais cette technique a évolué et **Van DEURSEN, P. et coll.**, en 2010 montré que la version 2.0 utilisée dans notre travail présentait également d'excellentes performances sur DBS lorsque les conditions de transport et de conservation étaient respectées.⁽¹²⁰⁾

Ces résultats ont été confirmés au Sénégal avec les travaux de **Touré-Kane, C. et coll.** qui a comparé les performances du Nuclisens EasyQ HIV-1 V2.0 à celles du Nuclisens EasyQ HIV-1 V1.2 Elle a montré que cette V2.0 était plus précise et fiable pour la quantification de la charge virale du VIH-1 par rapport à la version 1.2 en termes de spécificité et de sensibilité

mais aussi qu'elle présentait une bonne corrélation et une bonne concordance sur le plasma et sur DBS.⁽¹⁹⁾

Cette technique a également fait l'objet de comparaison avec de nombreuses autres techniques commerciales.

Sur le papier buvard, les comparaisons avec le m2000rt des laboratoires Abbott ont montré de bonnes corrélations sur différentes populations :

- **Garrido, C et coll. en 2009** en Espagne qui a comparé les résultats de charge virale de 103 échantillons de sang, collectés et séchés sur papier buvard 903 et a obtenu une bonne corrélation ($R=0,87$) avec la version 1.1 de NucliSENS.⁽⁴³⁾
- **ARREDONDO, M. et coll. en 2012 en Espagne** a retrouvé une corrélation entre plasma et DBS de $R=0,91$ ($P<0,001$).⁽⁶⁾
- **David S et coll.** réalisé dans le Sud de l'Inde en 2012, a comparé les valeurs des charges virales obtenues parallèlement sur plasma et DBS sur 62 patients et a obtenu une corrélation $R=0.9818$ ⁽³⁴⁾

Sur le plasma, **Xu, S. et coll.** ont comparé en 2010 les performances du Nuclisens EasyQ V2.0 avec six méthodes commerciales (*Cobas Amplicor HIV-1 Monitor V1.5 ('Amplicor')*, *Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 test V1.0 ('CAP/CTM')*, *Versant HIV-1 RNA V3.0 (branched DNA [bDNA]-based assay; 'Versant bDNA')*, *Abbott Real Time HIV-1 assay ('Abbott Real Time')*, *Nuclisens HIV-1 QT, et Nuclisens EasyQ HIV-1 V1.1*) de quantification de la charge virale du VIH-1. Dans l'ensemble, EasyQ V2.0 présentait une corrélation significative et une concordance élevée avec les six autres techniques.⁽¹²⁵⁾

En 2012, **Xu, S. et coll.** ont comparé les technologies Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 v2.0 et sa version 1 avec la technologie Nuclisens HIV-1 EasyQ v2.0 pour la mesure de la charge virale des divers génotypes de VIH-1 en Chine. Nuclisens EasyQ v2.0 et CAP/CTM v2.0 a montré une excellente détection des échantillons du sous-type B mais des différences significatives ont été observées pour tester les échantillons de sous -type non B.⁽¹²⁴⁾

2. La méthodologie

Notre travail a porté sur 31 échantillons mais 5 comparaisons différentes ont été réalisées avec 100 µl de plasma et 4 volumes différents de sang (50µl, 75µl, 100 et 150µl) déposés sur le papier buvard soit une total de 155 échantillons analysés.

Les spots de DBS ainsi que la séparation lymphocytaire ont été réalisés dans l'heure après réception des échantillons puis conservés à – 80°C dans les sacs de glycine avec des sachets de déssicants jusqu'à leur utilisation.

Dans les autres travaux, le volume de dépôt est généralement de 50µl mais dans le travail de **ROTTINGHAUS, E.** le volume déposé était de 100 µl.⁽¹⁰⁰⁾

De même la température et le temps de conservation n'est pas toujours la même dans les différents travaux :

- conservation à 37°C pendant 8 et 15 jours pour **Toure-Kane, C. et coll.**,⁽⁶⁰⁾
- conservation à -20°C pour **ARREDONDO, M. et coll.** jusqu'à utilisation.⁽⁶⁾
- conservation à 80°C dans l'étude de **ROTTINGHAUS, E. et coll.** jusqu'à utilisation.⁽¹⁰⁰⁾

Comme dans la plupart des travaux publiés, le Puncheur calibré 12 des laboratoires Biomérieux, nous a permis d'obtenir des spots de 12 mm de diamètre correspondant à la totalité de l'anneau sur le papier buvard. Cependant pour les volumes 100 et 150µl, les spots obtenus ne correspondent pas à toute la surface de la tache de sang déposé car le dépôt réalisé avec ces volumes débordent largement la surface de l'anneau de la carte.

3. Les résultats

3.1. Plasma vs DBS

Les résultats de charge virale des plasmas obtenus varient entre 670 et 2 700 000 copies/ml soit compris entre 2 log et > 5 log. Quatorze échantillons avaient une charge très élevée et onze une charge virale élevée.

La différence de log des valeurs des charges virales obtenues avec les plasmas et différents DBS nous montre 12 échantillons discordants mais que le nombre de discordances est quasiment le même quelque le volume considéré. De même, les moyennes des différences sont à peu près similaires avec -0.24 pour le DBS_50, -0.305 pour DBS_75, -0.254 pour DBS_100 et -0.268 pour DBS_150.

Cependant, les résultats du Bland-Altman (Plasma *vs* DBS 50 ; Plasma *vs* 150) montrent 4 échantillons sortant de l'intervalle de confiance en dessous de la limite inférieure, avec des biais de – 0,24 [- 0,346 à - 0,135] et – 0,268 [-0,379 à - 0,157]. Ces 4 échantillons sont ceux qui s'éloignent le plus du biais. Leurs droites de régression linéaire ont respectivement comme coefficient 0,955 et 0,952.

Le résultat du Bland-Altman entre Plasma *vs* DBS 75 montre 5 échantillons hors de l'intervalle de confiance avec un biais de – 0,305 [- 0,408 à - 0,202] en dessous de la limite inférieure. Sa droite de régression linéaire a un coefficient R = 0,956.

Le résultat du Bland-Altman entre Plasma *vs* DBS 100 montre 4 échantillons hors de l'intervalle de confiance avec un biais de – 0,254 [- 0,343 à - 0,165] en dessous de la limite inférieure. Sa droite de régression linéaire a un coefficient R = 0,968.

Néanmoins, les valeurs des ΔLog en valeur non absolue entre le plasma et les différents DBS confirment comme le plasma comme meilleur matrice pour la quantification de la charge virale, mais que les valeurs sur le DBS ne sont pas très éloignées.

3.2. DBS *vs* DBS

Les résultats de la charge virale obtenus sur différents DBS montrent 6 discordances correspondantes à 5 échantillons. Pour un échantillon, la discordance a été noté entre DBS 50 *vs* 75 et DBS 75 *vs* 150.

Les discordances ne sont notées que pour les valeurs de CVP > à 3 log et notamment entre les DBS 50 *vs* 75, DBS 50 *vs* 150 et DBS 75 *vs* 150. Ceci pourrait être lié au faible nombre d'échantillons à CVP < 3log.

Cependant, le Bland-Altman DBS 50 *vs* 75 montre un échantillon hors de l'intervalle de confiance, en dessous de la limite inférieure avec un écart très grand du biais qui est de – 0,0645 [- 0,169 à 0,402]. Sa droite de régression linéaire a un coefficient de 0,956.

Le Bland-Altman DBS 75 *vs* 150 montre un échantillon hors de l'intervalle de confiance, en dessus de la limite supérieure avec un biais de 0,0369 [- 0,069 à 0,135]. Sa droite de régression linéaire a un coefficient de 0,963.

Aucune discordance n'a été noté pour les volumes DBS 50 *vs* 100, DBS 75 *vs* 100 et DBS 100 *vs* 150.

La comparaison des moyennes des différences montre une différence extrêmement faible entre les volumes et que le DBS_100 (-0.0139) est celui qui est le plus proche du DBS_50.

CONCLUSION

Le VIH est le virus responsable de la pandémie mondiale du SIDA, qui touche de nos jours plus de 34 millions de personnes à travers le monde avec plus de 1,7 millions de décès par an. L'Afrique demeure toujours la région du monde la plus touchée avec plus de 23,5 millions de personnes vivant avec le VIH-SIDA.

Depuis la découverte du VIH en 1983, des efforts considérables ont été déployés pour le diagnostic, la prévention et la PEC des PVVIH. C'est grâce à ces efforts que le rapport de l'ONUSIDA 2012 a fait état d'une chute de 21% du taux annuel de nouvelles infections entre 1997 et 2010.

L'accessibilité du TARV a également permis la réduction des nouvelles infections mais aussi du nombre de décès annuel lié au VIH-SIDA grâce au développement de programmes d'accès aux ARV comme le programme ISAARV au Sénégal, qui a permis d'améliorer la qualité de vie des PVVIH. Ce programme prend en charge le suivi virologique des patients en plus de la mise sous TARV si l'indication est posée.

Ce suivi virologique au cours du TARV est nécessaire pour évaluer l'état d'immunodépression du malade et apprécier la réponse au traitement. Cependant, au Sénégal comme dans la plupart des pays à ressources limitées, le taux de CD4 est disponible même en zone décentralisée, alors que la charge virale et le génotype ne sont disponibles que dans le laboratoire de référence. L'accessibilité de ce marqueur reste un challenge majeur du processus de décentralisation du suivi virologique des PVVIH.

Cette inaccessibilité est due au coût élevé (50 à 100 USD par test), le nombre limité d'infrastructures adéquates, le défaut de personnel qualifié et la logistique (difficultés liées au transport et à la conservation des prélèvements sur tube). L'utilisation du papier buvard pour le prélèvement de sang dans le suivi virologique a été approuvée par l'OMS, ce qui permet de faire les prélèvements en zone décentralisée et de les envoyer au niveau de laboratoire. Ce transport des prélèvements DBS au niveau central a été validé pour un délai maximum de 15 jours sans perte significative d'ARN viral. La plupart d'études de charge virale sur DBS ont rapportées la validité de l'utilisation de 2 spots de 50µl de DBS (de 12mm de diamètre) pour la quantification de la charge virale, et c'est dans ce contexte que cette étude a été menée avec pour objectif d'évaluer l'impact du volume de sang déposé sur le papier buvard, sur la valeur de la charge virale mesurée. Elle a eu pour cadre l'unité de Biologie moléculaire du Laboratoire Bactériologie-Virologique A. Le Dantec. L'étude évaluative a porté sur 31 patients naïfs de traitement antirétroviral, ceci afin d'avoir des valeurs de charge virale élevées, qui permettraient une analyse statistique plus aisée. Des DBS de différents volumes de sang total ont été réalisés sur le papier buvard Whatman 903, avec 6 cartes pour chaque échantillon (1

carte chacune pour les volumes 50 et 75 μ l et, 2 cartes pour les 100 et 150 μ l). La référence a été le plasma et les valeurs de charge virale plasmatique détectables variaient entre 670 et 2 700 000 copies/ml soit, converties en valeurs logarithmiques, entre 2,83 log et 6,43 log. Pour faciliter les analyses et se conformer à l'interprétation classique des résultats de charge virale, elles ont été classées en valeur faible, moyenne, élevée et très élevée. Ainsi quatorze échantillons avaient une CVP très élevée (> 5 log), 11 avec une CVP élevée (entre 4 et 5 log), 2 avec une CVP faible (< 3 log) et 4 avec une CVP modérée (entre 3 et 4 log).

La comparaison des valeurs de charges virale plasmatique des différents échantillons de DBS a été réalisée en calculant leur différence de log avec le plasma. Globalement quel que soit le volume de sang déposé, 12 échantillons ont présenté une discordance entre plasma et DBS avec une différence de log comprise entre 0,51 et 1. Parmi ces 12 échantillons, 6 ne sont discordants que pour un seul volume de DBS dont 3 pour les DBS 150, 4 sont discordants pour plus de 2 volumes et 2 sont discordants pour plus de 3 volumes de sang déposé sur carte.

Les différences de log entre plasma et les différents volumes sur DBS a montré que pour chacun des volumes de sang déposé sur les cartes, la majorité des échantillons (entre 25 et 27) présente des résultats concordants avec une différence de log en valeur absolue inférieure à 0,5 c'est-à-dire non significative. Le nombre d'échantillons discordants ($\Delta\log > 0,5$ en valeur absolue) ne varie pas beaucoup (entre 4 et 6) selon le volume de sang déposé :

- ✓ 6 échantillons sur 31 (19,35%) pour la valeur du $\Delta\log$ entre le plasma et DBS_50
- ✓ 5 échantillons sur 31 (16,13%) pour la valeur du $\Delta\log$ entre le plasma et DBS_75
- ✓ 4 échantillons sur 31 (12,9%) pour la valeur du $\Delta\log$ entre le plasma et DBS_100
- ✓ 6 échantillons sur 31 (19,35%) pour la valeur du $\Delta\log$ entre le plasma et DBS_150.

L'analyse des discordances a montré qu'elles concernaient essentiellement les échantillons dont les valeurs ont été supérieures à 4 log. Seul 1 échantillon de charge virale plasmatique en dessous de 4 log (670 copies/ml) a présenté une discordance; celle-ci est observée uniquement pour un dépôt de 150 μ l de sang sur carte. Pour tous les 12 échantillons correspondant à 21 cas de discordances vis-à-vis du plasma, les valeurs des CVP ont été supérieures à celles obtenues avec les différents volumes de DBS. Les courbes de concordances avec les moyennes des différences sont à peu près similaires quel que soit le volume considéré avec -0,24 pour le DBS_50, -0,305 pour DBS_75, -0,254 pour DBS_100 et -0,268 pour DBS_150.

La Comparaison des valeurs de charge virale obtenues sur DBS a montré que quel que soit le volume de sang déposé considéré, 5 échantillons ont présenté une discordance entre les différents volumes de DBS avec une différence de log en valeur absolue comprise entre 0,69 et 0,76. Parmi ces 5 échantillons, 1 seul présentait une discordance pour 2 volumes (DBS_50/75

et DBS_75/150) soit un total de 6 discordances. Le Bland-Altman DBS 75 vs 150 montre un échantillon hors de l'intervalle de confiance, en dessus de la limite supérieure avec un biais de 0,0369 [- 0,069 à 0,135 Aucune discordance n'a été noté pour les volumes DBS 50 vs 100, DBS 75 vs 100 et DBS 100 vs 150. La comparaison des moyennes des différences a montré une différence extrêmement faible entre les volumes mais aussi que le DBS_100 (-0.0139) est celui qui est le plus proche du DBS_50.

Ces résultats montrent que le papier buvard peut être utilisé comme un moyen alternatif pour le suivi virologique des PVVIH dans des sites n'ayant pas de micropipettes car le cercle pourrait servir de moyen d'appréciation du volume à déposer à condition que 1 le cercle de 12mm de diamètre circonscrit pour cet effet soit bien saturé.

Cependant, il serait nécessaire de poursuivre cette étude pour :

- ✓ d'une part évaluer les résultats sur le terrain en confectionnant les spots au site de prise en charge clinique
- ✓ d'autre part d'évaluer la possibilité d'utiliser aussi des spots de sang capillaire pour rendre l'outil encore plus accessible.

Références bibliographiques

1. Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. MMWR Morbidity and mortality weekly report. 1981;30(21):250-2. Epub 1981/06/05.
2. Epidemiologic Notes and Reports Persistent, Generalized Lymphadenopathy among Homosexual Males. MMWR Morbidity and mortality weekly report. 1982;31(19):249-51 Epub 1982/05/21.
3. RAPPORT ONUSIDA SUR L'EPIDEMIE MONDIALE DE SIDA. 2012.
4. RAPPORT DE SITUATION SUR LA RIPOSTE NATIONALE A L'ÉPIDÉMIE DE VIH/SIDA SÉNÉGAL : 2010-2011. In: SIDA CNdLcl, editor. 2012.
5. WHO Guidelines for PTMTCT & Breastfeeding2013.
6. Arredondo M, Garrido C, Parkin N, Zahonero N, Bertagnolio S, Soriano V, et al. Comparison of HIV-1 RNA measurements obtained by using plasma and dried blood spots in the automated abbott real-time viral load assay. Journal of clinical microbiology. 2012;50(3):569-72. Epub 2011/12/16.
7. Baggaley RF, Boily MC, White RG, Alary M. Risk of HIV-1 transmission for parenteral exposure and blood transfusion: a systematic review and meta-analysis. AIDS. 2006;20(6):805-12. Epub 2006/03/22.
8. Barin F, M'Boup S, Denis F, Kanki P, Allan JS, Lee TH, et al. Serological evidence for virus related to simian T-lymphotropic retrovirus III in residents of west Africa. Lancet. 1985;2(8469-70):1387-9. Epub 1985/12/21.
9. BARRE-SINOUESSI F. Les VIH, rappel virologique Impact Médecin-Guide. SIDA1997. p. 12-20p.
10. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science. 1983;220(4599):868-71. Epub 1983/05/20.
11. Beyrer C, Baral SD, van Griensven F, Goodreau SM, Chariyalertsak S, Wirtz AL, et al. Global epidemiology of HIV infection in men who have sex with men. Lancet. 2012;380(9839):367-77. Epub 2012/07/24.
12. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. Journal of clinical microbiology. 1990;28(3):495-503. Epub 1990/03/01.

13. **Bowers M.** Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. BETA bulletin of experimental treatments for AIDS : a publication of the San Francisco AIDS foundation. 1996;19-22. Epub 1996/06/01.
14. **Broder S.** Twenty-five years of translational medicine in antiretroviral therapy: promises to keep. Science translational medicine. 2010;2(39):39ps3. Epub 2010/07/09.
15. **Brossard Y, Aubin JT, Mandelbrot L, Bignozzi C, Brand D, Chaput A, et al.** Frequency of early in utero HIV-1 infection: a blind DNA polymerase chain reaction study on 100 fetal thymuses. AIDS. 1995;9(4):359-66. Epub 1995/04/01.
16. **Brun-Vezinet F., Wainberg M.,** HIV : Structure, multiplication et physiopathologie. In: ESTEM, editor. Traité de virologie médicale2003. p. 319-27.
17. **Burgard M, Jasseron C, Matheron S, Damond F, Hamrene K, Blanche S, et al.** Mother-to-child transmission of HIV-2 infection from 1986 to 2007 in the ANRS French Perinatal Cohort EPF-CO1. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2010;51(7):833-43. Epub 2010/09/02.
18. **BURGARD M., MAYAUX M.J., BLANCHE S., et al.** . The use of viral culture and p24 antigen testing to diagnose human immunodeficiency virus infection in neonates. N Engl J Med. 1992;327:1192-7.
19. **C. Touré-Kane HD-N, S. Diallo, C. Thiombiano, N. Leye, O. Ndiaye, K. Kébé, M. Thiam, A.A.M. Diaoura, S. Mboup.** Performance of Nuclisens HIV-1 EasyQ Version 2.0 compared with HIV-1 EasyQ Version 1.2 in Sénégal. ICASA 20112011.
20. **CASSUTO J. P., PESCE A., QUARANTA J. F. .** Chap 6 : DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE L'INFECTION PAR LE VIH. In: MASSON, editor. Sida et infection par le VIH. 3^{ème} ed. p. 66p.
21. **Chapman TM, Plosker GL, Perry CM.** Fosamprenavir: a review of its use in the management of antiretroviral therapy-naïve patients with HIV infection. Drugs. 2004;64(18):2101-24. Epub 2004/09/03.
22. **Charneau P, Borman AM, Quillent C, Guetard D, Chamaret S, Cohen J, et al.** Isolation and envelope sequence of a highly divergent HIV-1 isolate: definition of a new HIV-1 group. Virology. 1994;205(1):247-53. Epub 1994/11/15.
23. **Checkley MA, Luttge BG, Freed EO.** HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. Journal of molecular biology. 2011;410(4):582-608. Epub 2011/07/19.

24. Chermann JC, Barre-Sinoussi F, Dauguet C, Brun-Vezinet F, Rouzioux C, Rozenbaum W, et al. Isolation of a new retrovirus in a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome. *Antibiotics and chemotherapy*. 1983;32:48-53. Epub 1983/01/01.
25. Choisy M, Woelk CH, Guegan JF, Robertson DL. Comparative study of adaptive molecular evolution in different human immunodeficiency virus groups and subtypes. *Journal of virology*. 2004;78(4):1962-70. Epub 2004/01/30.
26. Chukkapalli V, Ono A. Molecular determinants that regulate plasma membrane association of HIV-1 Gag. *Journal of molecular biology*. 2011;410(4):512-24. Epub 2011/07/19.
27. Clavel F, Hance AJ. HIV drug resistance. *The New England journal of medicine*. 2004;350(10):1023-35. Epub 2004/03/05.
28. CLAVEL F., GUETARD D., . Isolation of new human retrovirus from west Africa patients with AIDS. *Science*,. 1986 Jul.;18 (233 (4761)): 343- 6.
29. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, Kumarasamy N, et al. Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. *The New England journal of medicine*. 2011;365(6):493-505. Epub 2011/07/20.
30. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*. 1991;350(6313):91-2. Epub 1991/03/07.
31. Connor EM, Sperling RS, Gelber R, Kiselev P, Scott G, O'Sullivan MJ, et al. Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *The New England journal of medicine*. 1994;331(18):1173-80. Epub 1994/11/03.
32. DARELL WARD. Comprendre le VIH/SIDA : 4^{ème} chap : Infection par le VIH et progression de la maladie. Nouveaux Horizons ed2002. p. 65p.
33. DARELL WARD. 2^{ème} Chap : dépistage du VIH. Comprendre le VIH/SIDA: Nouveaux Horizons; 2002. p. 24p.
34. David S, Sachithanandham J, Jerobin J, Parasuram S, Kannangai R. Comparison of HIV-1 RNA level estimated with plasma and DBS samples: a pilot study from India (South). *Indian journal of medical microbiology*. 2012;30(4):403-6. Epub 2012/11/28.
35. de Mendoza C, Koppelman M, Montes B, Ferre V, Soriano V, Cuypers H, et al. Multicenter evaluation of the NucliSens EasyQ HIV-1 v1.1 assay for the quantitative detection of HIV-1 RNA in plasma. *Journal of virological methods*. 2005;127(1):54-9. Epub 2005/05/17.

36. **DILLON B., HECHT F.M., SWANSON M.** . Primary HIV infections associated with oral transmission. 7th conference on retroviruses and opportunists infections; San Francisco2000; Abstract 473.
37. **Do T, Duncan J, Butcher A, Liegler T.** Comparative frequencies of HIV low-level viremia between real-time viral load assays at clinically relevant thresholds. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology. 2011;52 Suppl 1:S83-9. Epub 2011/10/15.
38. **Eholié S. P., Girard P-M., Bissagnéné E., Dariosecq J-M., Inwoley A., Sow P. S., Taburet A-M., Traoré H. A.** Memento Thérapeutique du VIH/SIDA en Afrique. 2^{ème} ed2009. p. 8p.
39. **FATTORUSSO V., RITTER O.** . Vademecum Clinique “Du diagnostic au traitement”. 17^{ème} ed2004. p. 442p
40. **Fiorentini S, Marini E, Caracciolo S, Caruso A.** Functions of the HIV-1 matrix protein p17. The new microbiologica. 2006;29(1):1-10. Epub 2006/04/13.
41. **Gao F, Yue L, Robertson DL, Hill SC, Hui H, Biggar RJ, et al.** Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. Journal of virology. 1994;68(11):7433-47. Epub 1994/11/01.
42. **Garrick MD, Dembure P, Guthrie R.** Sickle-cell anemia and other hemoglobinopathies. Procedures and strategy for screening employing spots of blood on filter paper as specimens. The New England journal of medicine. 1973;288(24):1265-8. Epub 1973/06/14.
43. **Garrido C, Zahonero N, Corral A, Arredondo M, Soriano V, de Mendoza C.** Correlation between human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA measurements obtained with dried blood spots and those obtained with plasma by use of Nuclisens EasyQ HIV-1 and Abbott RealTime HIV load tests. Journal of clinical microbiology. 2009;47(4):1031-6. Epub 2009/02/06.
44. **Giagulli C, Magiera AK, Bugatti A, Caccuri F, Marsico S, Rusnati M, et al.** HIV-1 matrix protein p17 binds to the IL-8 receptor CXCR1 and shows IL-8-like chemokine activity on monocytes through Rho/ROCK activation. Blood. 2012;119(10):2274-83. Epub 2012/01/21.
45. **GOEDERT J. J., DULIEGE AM., AMOS CI., et al.** . High risk of infection with HIV-1 for first-born twins. The Lancet infectious diseases. 1991;338:1471-5.
46. **Gorry PR, Ancuta P.** Coreceptors and HIV-1 pathogenesis. Current HIV/AIDS reports. 2011;8(1):45-53. Epub 2010/12/29.

47. **Gougeon M. L., Montagnier L.** Apoptose in AIDS (published erratum in Science, 1993;260:1709). In: Science, editor.1993. p. 1269-70.
48. **Grenier B, Dubreuil M, Journois D.** [Comparison of two measurement methods: the Bland and Altman assessment]. Annales francaises d'anesthesie et de reanimation. 2000;19(2):128-35. Epub 2000/03/24. Comparaison de deux methodes de mesure d'une meme grandeur: methode de Bland et Altman.
49. **Grewé B, Überla K.** The human immunodeficiency virus type 1 Rev protein: menage à trois during the early phase of the lentiviral replication cycle. The Journal of general virology. 2010;91(Pt 8):1893-7. Epub 2010/06/12.
50. **Guthrie R, Susi A.** A Simple Phenylalanine Method for Detecting Phenylketonuria in Large Populations of Newborn Infants. Pediatrics. 1963;32:338-43. Epub 1963/09/01.
51. **Guyader M, Emerman M, Sonigo P, Clavel F, Montagnier L, Alizon M.** Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. Nature. 1987;326(6114):662-9. Epub 1987/04/16.
52. **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. J Acquir Immune Defic Syndr. 1992;5(5):505-12. Epub 1992/01/01.
53. **HALPERIN D.T., SHIBOSKI S.C., PALEFSKI J.M., PADIAN N.** . High level of HIV1 intercourse infection from and intercourse; a neglected risk factor in heterosexual AIDS prevention. XIV International AIDS conference; Barcelona2002. p. ThPe C7439.
54. **Hannon WH, Lewis DS, Jones WK, Powell MK.** A quality assurance program for human immunodeficiency virus seropositivity screening of dried-blood spot specimens. Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America. 1989;10(1):8-13. Epub 1989/01/01.
55. **Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S.** Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. AIDS. 2011;25(5):679-89. Epub 2011/02/08.
56. **Jani IV, Sabatier J, Vubil A, Subbarao S, Bila D, de Sousa A, et al.** Evaluation of a high-throughput diagnostic system for detection of HIV-1 in dried blood spot samples from infants in Mozambique. Journal of clinical microbiology. 2012;50(4):1458-60. Epub 2012/01/27.
57. **Johannessen A, Garrido C, Zahonero N, Sandvik L, Naman E, Kivuyo SL, et al.** Dried blood spots perform well in viral load monitoring of patients who receive antiretroviral

treatment in rural Tanzania. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2009;49(6):976-81. Epub 2009/08/12.

58. Kahn JO, Walker BD. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. The New England journal of medicine. 1998;339(1):33-9. Epub 1998/07/02.

59. KAHN W.A., RICHARDSON C., MANDELIA S., BARTON S.E. Safer sex in HIV infected patients in london : practices and risks sex transm infect. 2001;77:394.

60. Kane CT, Ndiaye HD, Diallo S, Ndiaye I, Wade AS, Diaw PA, et al. 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):291-5. Epub 2008/02/05.

61. Kanyalkar M, Srivastava S, Saran A, Coutinho E. Conformational study of fragments of envelope proteins (gp120: 254-274 and gp41: 519-541) of HIV-1 by NMR and MD simulations. Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society. 2004;10(6):363-80. Epub 2004/06/25.

62. Kapadia F, Vlahov D, Donahoe RM, Friedland G. The role of substance abuse in HIV disease progression: reconciling differences from laboratory and epidemiologic investigations. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2005;41(7):1027-34. Epub 2005/09/06.

63. Kobayashi M, Yoshinaga T, Seki T, Wakasa-Morimoto C, Brown KW, Ferris R, et al. In Vitro antiretroviral properties of S/GSK1349572, a next-generation HIV integrase inhibitor. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2011;55(2):813-21. Epub 2010/12/01.

64. LAPOINTE N., MICHAUD J., PEKOVID D., et coll. . L'infection au VIH de la Mère à l'Enfant. Collection dirigée par le Professeur GENTILINI MARE. Marketing/Ellipses ed. Paris1995. p. 95p.

65. LAPORTE A. SIDA et Infection par VIH : définition. chap.I Tiré de SIDA et Infection par VIH par MONTAIGNIER L., ROZENBAUM W, GLUCKMAN J. C Médecine – Sciences Flammarion, Paris; 1983. p. 593p.

66. Le Rouzic E, Benichou S. The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. Retrovirology. 2005;2:11. Epub 2005/02/24.

67. Leelawiwat W, Young NL, Chaowanachan T, Ou CY, Culnane M, Vanprapa N, et al. Dried blood spots for the diagnosis and quantitation of HIV-1: stability studies and evaluation of sensitivity and specificity for the diagnosis of infant HIV-1 infection in Thailand. Journal of virological methods. 2009;155(2):109-17. Epub 2008/10/28.

68. **Leroy V, Newell ML, Dabis F, Peckham C, Van de Perre P, Butlyrs M, et al.** International multicentre pooled analysis of late postnatal mother-to-child transmission of HIV-1 infection. Ghent International Working Group on Mother-to-Child Transmission of HIV. Lancet. 1998;352(9128):597-600. Epub 1998/09/24.
69. **Leynaert B, Downs AM, de Vincenzi I.** Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus: variability of infectivity throughout the course of infection. European Study Group on Heterosexual Transmission of HIV. American journal of epidemiology. 1998;148(1):88-96. Epub 1998/07/15.
70. **Li L, Chen L, Yang S, Li T, Li J, Liu Y, et al.** Recombination form and epidemiology of HIV-1 unique recombinant strains identified in Yunnan, China. PloS one. 2012;7(10):e46777. Epub 2012/10/12.
71. **Li ZY, Zhan P, Liu XY.** [Progress in the study of HIV-1 Vif and related inhibitors]. Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica. 2010;45(6):684-93. Epub 2010/10/14.
72. **Liberatore D, Avila MM, Calarota S, Libonatti O, Martinez Peralta L.** Diagnosis of perinatally acquired HIV-1 infection using an IgA ELISA test. Pediatric AIDS and HIV infection. 1996;7(3):164-7. Epub 1996/06/01.
73. **Liu B, Li Z.** Endoplasmic reticulum HSP90b1 (gp96, grp94) optimizes B-cell function via chaperoning integrin and TLR but not immunoglobulin. Blood. 2008;112(4):1223-30. Epub 2008/05/30.
74. **Mandala S, Westrop SJ, Beck EJ, Nelson M, Gazzard BG, Imami N.** Are long-term non-progressors very slow progressors? Insights from the Chelsea and Westminster HIV cohort, 1988-2010. PloS one. 2012;7(2):e29844. Epub 2012/03/01.
75. **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):106-9. Epub 2011/12/27.
76. **Mei JV, Alexander JR, Adam BW, Hannon WH.** Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. The Journal of nutrition. 2001;131(5):1631S-6S. Epub 2001/05/08.
77. **Menu E, Mbopi-Keou FX, Lagaye S, Pissard S, Mauclere P, Scarlatti G, et al.** Selection of maternal human immunodeficiency virus type 1 variants in human placenta.

European Network for In Utero Transmission of HIV-1. The Journal of infectious diseases. 1999;179(1):44-51. Epub 1998/12/08.

78. **Modrow S, Hoflacher B, Gurtler L, Deinhardt F, Wolf H.** Carrier bound synthetic oligopeptides in ELISA test systems for distinction between HIV-1 and HIV-2 infection. J Acquir Immune Defic Syndr. 1989;2(2):141-8. Epub 1989/01/01.

79. **Monleau M, Montavon C, Laurent C, Segondy M, Montes B, Delaporte E, et al.** Evaluation of different RNA extraction methods and storage conditions of dried plasma or blood spots for human immunodeficiency virus type 1 RNA quantification and PCR amplification for drug resistance testing. Journal of clinical microbiology. 2009;47(4):1107-18. Epub 2009/02/06.

80. **Montavon C, Toure-Kane C, Liegeois F, Mpoudi E, Bourgeois A, Vergne L, et al.** Most env and gag subtype A HIV-1 viruses circulating in West and West Central Africa are similar to the prototype AG recombinant virus IBNG. J Acquir Immune Defic Syndr. 2000;23(5):363-74. Epub 2000/06/24.

81. **Mylonakis E, Paliou M, Rich JD.** Plasma viral load testing in the management of HIV infection. American family physician. 2001;63(3):483-90, 95-6. Epub 2001/03/29.

82. **Nduati R, John G, Mbori-Ngacha D, Richardson B, Overbaugh J, Mwatha A, et al.** Effect of breastfeeding and formula feeding on transmission of HIV-1: a randomized clinical trial. JAMA : the journal of the American Medical Association. 2000;283(9):1167-74. Epub 2000/03/07.

83. **Nehar S, Mishra M, Heese K.** Identification and characterisation of the novel amyloid-beta peptide-induced protein p17. FEBS letters. 2009;583(19):3247-53. Epub 2009/09/17.

84. **Nielsen MH, Pedersen FS, Kjems J.** Molecular strategies to inhibit HIV-1 replication. Retrovirology. 2005;2:10. Epub 2005/02/18.

85. **NOUVO G.J., BECKER J., BURK M.W., et al.** In situ detection of PCR-amplified HIV-1 nucleic acids in lymph nodes and peripheral blood in patients with asymptomatic HIV-1 infection and advanced-stage AIDS. J Acquir Immuno Defic Syndr. 1994;7:916-23.

86. **Nyamweya S, Hegedus A, Jaye A, Rowland-Jones S, Flanagan KL, Macallan DC.** Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis. Reviews in medical virology. 2013;23(4):221-40. Epub 2013/02/28.

87. **OMS.** Traitement Antirétroviral de l'infection à VIH SIDA chez l'adulte et l'adolescent: recommandations pour une approche de santé publique2010.

88. **OMS.** O. Améliorer d'urgence l'accès aux traitements antirétroviraux dans les pays à ressources limitées : recommandations techniques et opérationnelles en vue de traiter trois millions de personnes d'ici 2005. Rapport d'une réunion internationalede consensus de l'OMS et de l'ONUSIDA sur les recommandations techniques et opérationnelles relatives à une généralisation rapide de l'accès à la thérapie antirétrovirale dans les pays à ressources limitées, 18-21 novembre 2003, Lusaka (Zambie) Organisation mondiale, 2003.
89. **Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS.** New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *The New England journal of medicine.* 1993;328(5):327-35. Epub 1993/02/04.
90. **Parent LJ, Gudleski N.** Beyond plasma membrane targeting: role of the MA domain of Gag in retroviral genome encapsidation. *Journal of molecular biology.* 2011;410(4):553-64. Epub 2011/07/19.
91. **Paul W. E.** Can the immune response control HIV infection? *Cell biochemistry and biophysics.* 1995;82:177-82.
92. **Peeters M, Delaporte E.** [Genetic diversity of HIV infection worldwide and its consequences]. *Medecine tropicale : revue du Corps de sante colonial.* 1999;59(4 Pt 2):449-55. Epub 2000/07/21. Diversité génétique de l'infection à VIH dans le Monde et ses conséquences.
93. **PILLONEL J., LAPERCHE S., SAURA C., DESENCLOS JC., COUROUCE AM., AND THE TRANSFUSION-TRANSMISSIBLE AGENTS WORKING GROUP OF THE FRENCH SOCIETY OF BLOOD TRANSFUSSION.** . Trends in residual risk of transfusion-transmitted viral infection in France between 1992 and 2000. *Transfusion.* 2002;42:980-8.
94. **Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemee V, et al.** A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature medicine.* 2009;15(8):871-2. Epub 2009/08/04.
95. **Pozniak AL, Gallant JE, DeJesus E, Arribas JR, Gazzard B, Campo RE, et al.** Tenofovir disoproxil fumarate, emtricitabine, and efavirenz versus fixed-dose zidovudine/lamivudine and efavirenz in antiretroviral-naïve patients: virologic, immunologic, and morphologic changes--a 96-week analysis. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006;43(5):535-40. Epub 2006/10/24.
96. **Pulido F, Estrada V, Baril JG, Logue K, Schewe K, Plettenberg A, et al.** Long-term efficacy and safety of fosamprenavir plus ritonavir versus lopinavir/ritonavir in combination

with abacavir/lamivudine over 144 weeks. *HIV clinical trials.* 2009;10(2):76-87. Epub 2009/06/03.

97. **QUARANTA J.F., TICCHIONI M., VIVINUS-NEBOT M., et al.** 3^{ème} Partie : Le bilan immunohématologique de surveillance. Feuillets de Biologie. Infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)1991. p. 17-23.

98. **Ragupathy V, Zhao J, Wood O, Tang S, Lee S, Nyambi P, et al.** Identification of new, emerging HIV-1 unique recombinant forms and drug resistant viruses circulating in Cameroon. *Virology journal.* 2011;8:185. Epub 2011/04/26.

99. **Rothe M, Israel N, Barre-Sinoussi F.** Mécanismes de réplication virale des VIH. Médecine et thérapeutique1996. p. 12-8.

100. **Rottinghaus E, Bile E, Modukanele M, Maruping M, Mine M, Nkengasong J, et al.** 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. *Journal of clinical microbiology.* 2013;51(1):55-60. Epub 2012/10/19.

101. **Rottinghaus EK, Ugbena R, Diallo K, Bassey O, Azeez A, Devos J, et al.** 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):1187-95. Epub 2012/03/14.

102. **Rouzioux C, Costagliola D, Burgard M, Blanche S, Mayaux MJ, Griscelli C, et al.** Estimated timing of mother-to-child human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmission by use of a Markov model. The HIV Infection in Newborns French Collaborative Study Group. *American journal of epidemiology.* 1995;142(12):1330-7. Epub 1995/12/15.

103. **Rozenbaum W.** Indications thérapeutiques des antirétroviraux. Les dossiers du praticien : Guide SIDA1997. p. 107-18.

104. **Ruiz A, Guatelli JC, Stephens EB.** The Vpu protein: new concepts in virus release and CD4 down-modulation. *Current HIV research.* 2010;8(3):240-52. Epub 2010/03/06.

105. **Rulli SJ, Jr., Muriaux D, Nagashima K, Mirro J, Oshima M, Baumann JG, et al.** Mutant murine leukemia virus Gag proteins lacking proline at the N-terminus of the capsid domain block infectivity in virions containing wild-type Gag. *Virology.* 2006;347(2):364-71. Epub 2006/01/24.

106. **Saada M, Le Chenadec J, Berrebi A, Bongain A, Delfraissy JF, Mayaux MJ, et al.** Pregnancy and progression to AIDS: results of the French prospective cohorts. SEROGEST and SEROCO Study Groups. *AIDS*. 2000;14(15):2355-60. Epub 2000/11/23.
107. **Scavalli CP, Mandelbrot L, Berrebi A, Batallan A, Cravello L, Pannier E, et al.** Twin pregnancy as a risk factor for mother-to-child transmission of HIV-1: trends over 20 years. *AIDS*. 2007;21(8):993-1002. Epub 2007/04/26.
108. **Simon F, Mauclere P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Muller-Trutwin MC, Saragosti S, et al.** Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nature medicine*. 1998;4(9):1032-7. Epub 1998/09/12.
109. **Solbak SM, Reksten TR, Hahn F, Wray V, Henklein P, Halskau O, et al.** HIV-1 p6 - a structured to flexible multifunctional membrane-interacting protein. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1828(2):816-23. Epub 2012/11/24.
110. **Sterjovski J, Churchill MJ, Wesselingh SL, Gorry PR.** HIV-1 entry inhibitors: classes, applications and factors affecting potency. *Current HIV research*. 2006;4(4):387-400. Epub 2006/11/01.
111. **Stettner MR, Nance JA, Wright CA, Kinoshita Y, Kim WK, Morgello S, et al.** SMAD proteins of oligodendroglial cells regulate transcription of JC virus early and late genes coordinately with the Tat protein of human immunodeficiency virus type 1. *The Journal of general virology*. 2009;90(Pt 8):2005-14. Epub 2009/05/08.
112. **Stevens W, Wiggill T, Horsfield P, Coetzee L, Scott LE.** Evaluation of the NucliSens EasyQ assay in HIV-1-infected individuals in South Africa. *Journal of virological methods*. 2005;124(1-2):105-10. Epub 2005/01/25.
113. **Stevenson M.** **HIV-1 pathogenesis.** *Nature medicine*. 2003;9(7):853-60. Epub 2003/07/02.
114. **Taiwo B, Murphy RL, Katlama C.** Novel antiretroviral combinations in treatment-experienced patients with HIV infection: rationale and results. *Drugs*. 2010;70(13):1629-42. Epub 2010/08/25.
115. **THIRY L., SPRECHER-GOLDBERGER S., JONCKHERT T., et al.** Isolation of AIDS virus from cell-free breast milk of three healthy virus carriers. *The Lancet infectious diseases*. 1989;891-2.
116. **Thomas JA, Gorelick RJ.** Nucleocapsid protein function in early infection processes. *Virus research*. 2008;134(1-2):39-63. Epub 2008/02/19.

117. **Toure-Kane C, Montavon C, Faye MA, Gueye PM, Sow PS, Ndoye I, et al.** Identification of all HIV type 1 group M subtypes in Senegal, a country with low and stable seroprevalence. AIDS research and human retroviruses. 2000;16(6):603-9. Epub 2000/04/25.
118. **Tyagi S, Bratu DP, Kramer FR.** Multicolor molecular beacons for allele discrimination. Nature biotechnology. 1998;16(1):49-53. Epub 1998/02/03.
119. **Tyagi S, Kramer FR.** Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. Nature biotechnology. 1996;14(3):303-8. Epub 1996/03/01.
120. **van Deursen P, Oosterlaken T, Andre P, Verhoeven A, Bertens L, Trabaud MA, et al.** Measuring human immunodeficiency virus type 1 RNA loads in dried blood spot specimens using NucliSENS EasyQ HIV-1 v2.0. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology. 2010;47(2):120-5. Epub 2009/12/19.
121. **Wang B, Lu X, Lu Y.** [Detection of proviral gene of human immunodeficiency virus type 1 from dried blood spots]. Zhonghua shi yan he lin chuang bing du xue za zhi = Zhonghua shiyan he linchuang bingduxue zazhi = Chinese journal of experimental and clinical virology. 1998;12(3):281-4. Epub 2003/01/16.
122. **Weusten JJ, Carpay WM, Oosterlaken TA, van Zuijlen MC, van de Wiel PA.** Principles of quantitation of viral loads using nucleic acid sequence-based amplification in combination with homogeneous detection using molecular beacons. Nucleic acids research. 2002;30(6):e26. Epub 2002/03/09.
123. **Whittall T, Peters B, Rahman D, Kingsley CI, Vaughan R, Lehner T.** Immunogenic and tolerogenic signatures in human immunodeficiency virus (HIV)-infected controllers compared with progressors and a conversion strategy of virus control. Clinical and experimental immunology. 2011;166(2):208-17. Epub 2011/10/12.
124. **Xu S, Song A, Nie J, Li X, Meng S, Zhang C, et al.** Comparison between the automated Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 test version 2.0 assay and its version 1 and Nuclisens HIV-1 EasyQ version 2.0 assays when measuring diverse HIV-1 genotypes in China. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology. 2012;53(1):33-7. Epub 2011/11/05.
125. **Xu S, Song A, Nie J, Li X, Wang Y.** Performance of Nuclisens HIV-1 EasyQ Version 2.0 compared with six commercially available quantitative nucleic acid assays for detection of HIV-1 in China. Molecular diagnosis & therapy. 2010;14(5):305-16. Epub 2010/11/09.

126. **Yao J, Liu Z, Ko LS, Pan G, Jiang Y.** Quantitative detection of HIV-1 RNA using NucliSens EasyQ HIV-1 assay. *Journal of virological methods*. 2005;129(1):40-6. Epub 2005/06/18.

127. **Zaunders J, van Bockel D.** Innate and Adaptive Immunity in Long-Term Non-Progression in HIV Disease. *Frontiers in immunology*. 2013;4:95. Epub 2013/05/01.

Annexe 1

Echantillons	100µl Plasma	2*50µl DBS	2*75µl DBS	2*100µl DBS	2*150µl DBS	Log 10 (100µl Plasma)	Log 10 (2*50µl DBS)	Log 10 (2*75µl DBS)	Log 10 (2*100µl DBS)	Log 10 (2*150µl DBS)	DLOG PL-50	DLOG PL-75	DLOG PL-100	DLOG PL-150	DLOG 50-75	DLOG 50-100	DLOG 50-150	DLOG 75-100	DLOG 75-150	DLOG 100-150
M. D	670	240	290	250	200	2,83	2,38	2,46	2,40	2,30	0,45	0,36	0,43	0,53	- 0,08	- 0,02	0,08	0,06	0,16	0,10
D. D	850	1100	810	390	420	2,93	3,04	2,91	2,59	2,62	- 0,11	0,02	0,34	0,31	0,13	0,45	0,42	0,32	0,29	- 0,03
10777 HALD	2200	980	940	970	1200	3,34	2,99	2,97	2,99	3,08	0,35	0,37	0,36	0,26	0,02	0,00	- 0,09	- 0,01	0,11	- 0,09
10738 HALD	2900	2100	5700	2700	2000	3,46	3,32	3,76	3,43	3,30	0,14	- 0,29	0,03	0,16	- 0,43	- 0,11	0,02	0,32	0,45	0,13
AM	4800	2700	2300	4400	1800	3,68	3,43	3,36	3,64	3,26	0,25	0,32	0,04	0,43	0,07	- 0,21	0,18	- 0,28	0,11	0,39
N. B	9400	15000	3900	9700	13000	3,97	4,18	3,59	3,99	4,11	- 0,20	0,38	- 0,01	- 0,14	0,59	0,19	0,06	- 0,40	0,52	- 0,13
10650 HALD	19000	11000	1900	5000	4300	4,28	4,04	3,28	3,70	3,63	0,24	1,00	0,58	0,65	0,76	0,34	0,41	- 0,42	0,35	0,07
11027 HALD	19000	8200	9100	15000	9300	4,28	3,91	3,96	4,18	3,97	0,36	0,32	0,10	0,31	- 0,05	- 0,26	- 0,05	- 0,22	0,01	0,21
10647 HALD	23000	5500	4800	9000	8400	4,36	3,74	3,68	3,95	3,9243	0,62	0,68	0,41	0,44	0,06	- 0,21	- 0,18	- 0,27	0,24	0,03
10802 HALD	25000	9100	4500	10000	22000	4,40	3,96	3,65	4,00	4,34	0,44	0,74	0,40	0,06	0,31	- 0,04	- 0,38	- 0,35	0,69	- 0,34
10920 HALD	26000	28000	20000	18000	15000	4,41	4,45	4,30	4,26	4,18	- 0,03	0,11	0,16	0,24	0,15	0,19	0,27	0,05	0,12	0,08
11001 HALD	28000	10000	10000	8600	4500	4,45	4,00	4,00	3,93	3,65	0,45	0,45	0,51	0,79	-	0,07	0,35	0,07	0,35	0,28
M. G	55000	15000	18000	13000	23000	4,74	4,18	4,26	4,11	4,36	0,56	0,49	0,63	0,38	- 0,08	0,06	- 0,19	0,14	0,11	- 0,25
10994 HALD	61000	43000	100000	110000	82000	4,79	4,63	5,00	5,04	4,91	0,15	- 0,21	- 0,26	- 0,13	- 0,37	- 0,41	- 0,28	- 0,04	0,09	0,13
M. Lu	88000	20000	20000	17000	10000	4,94	4,30	4,30	4,23	4,00	0,64	0,64	0,71	0,94	-	0,07	0,30	0,07	0,30	0,23
RF-78	90000	110000	46000	42000	96000	4,95	5,04	4,66	4,62	4,98	- 0,09	0,29	0,33	- 0,03	0,38	0,42	0,06	0,04	0,32	- 0,36
AKD	98000	39000	87000	74000	130000	4,99	4,59	4,94	4,87	5,11	0,40	0,05	0,12	- 0,12	- 0,35	- 0,28	- 0,52	0,07	0,17	- 0,24
A. T	110000	62000	71000	55000	90000	5,04	4,79	4,85	4,74	4,95	0,25	0,19	0,30	0,09	- 0,06	0,05	- 0,16	0,11	0,10	- 0,21
M. Di	120000	120000	110000	100000	180000	5,08	5,08	5,04	5,00	5,26	-	0,04	0,08	- 0,18	0,04	0,08	- 0,18	0,04	0,21	- 0,26
10649 HALD	160000	61000	100000	130000	98000	5,20	4,79	5,00	5,11	4,99	0,42	0,20	0,09	0,21	- 0,21	- 0,33	- 0,21	- 0,11	0,01	0,12
11057 HALD	220000	55000	120000	140000	85000	5,34	4,74	5,08	5,15	4,93	0,60	0,26	0,20	0,41	- 0,34	- 0,41	- 0,19	- 0,07	0,22	

Les concordances

Les discordances

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.

PERMIS D'IMPRIMER

Vu :

Le Président du jury

Vu :

Le Doyen de.....

Vu et Permis d'imprimer

Pour le Recteur, Président de l'Assemblée d'Université Cheikh Anta Diop de Dakar
et par délégation

Le Doyen

**EVALUATION DES DIFFERENTS VOLUMES DE SANG DEPOSES SUR PAPIER
BUVARD POUR LA QUANTIFICATION DE L'ARN VIRAL DU VIH-1 PAR LA
TECHNOLOGIE NUCLISENS EASYQ HIV-1 V2.0**

RESUME

Dans la plupart des pays à ressources limitées, le suivi virologique des personnes vivant avec le VIH se limite au niveau central. L'utilisation du papier buvard comme support alternatif de prélèvement améliore le suivi des personnes vivant en zone décentralisée. Cependant, l'exigence de déposer 50 μ l par cercle constitue aussi un frein d'où l'intérêt d'évaluer l'impact du volume de sang à déposer sur la valeur de la charge virale mesurée.

L'étude évaluative a porté sur 31 échantillons de patients naïfs de traitement antirétroviral.

Les DBS (papier de type Whatman 903) ont été réalisées avec différents volumes de sang (50, 75, 100 et 150 μ l), séchés pendant 3h puis conservés à -80°C jusqu'à utilisation. 2 spots de 12mm par carte ont été lysés puis extraits par le Nuclisens EasyMAG.

L'amplification/détection s'est faite par l'analyseur Nuclisens EasyQ.

La comparaison des valeurs de charge virale obtenues sur les plasmas et différents DBS (50, 75, 100 et 150) a été réalisée en calculant leur différence de log avec le plasma (référence). Pour tous les 12 échantillons correspondant à 21 cas de discordances vis-à-vis du plasma, les valeurs des charges virales plasmatiques ont été supérieures à celles obtenues avec les différents volumes de DBS. Les courbes de concordance avec les moyennes des différences sont à peu près similaires quel que soit le volume considéré avec -0.24 pour le DBS_50, -0.305 pour DBS_75, -0.254 pour DBS_100 et -0.268 pour DBS_150.

5 échantillons ont présenté une discordance entre les différents volumes de DBS avec une différence de log en valeur absolue comprise entre 0,69 et 0,76. La comparaison des moyennes des différences a montré une différence extrêmement faible entre les volumes mais aussi que le DBS_100 (-0.0139) est celui qui est le plus proche du DBS_50.

Ces résultats montrent que le papier buvard peut être utilisé comme un moyen alternatif pour le suivi virologique des personnes vivant avec le VIH dans des sites n'ayant pas de micropipettes car le cercle pourrait servir de moyen d'appréciation du volume à déposer à condition que le cercle de 12mm de diamètre circonscrit pour cet effet soit bien saturé.

Mots clés : DBS, Charge virale, VIH-1, Nuclisens EasyQ HIV-1 V2.0

M. NJAMPA NKWETCHOUA

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

★★★★★

FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTOLOGIE

★★★★★



ANNEE 2013

N°92

EVALUATION DES DIFFERENTS VOLUMES DE SANG DEPOSES SUR PAPIER BUVARD POUR LA QUANTIFICATION DE L'ARN VIRAL DU VIH-1 PAR LA TECHNOLOGIE NUCLISENS EASYQ HIV-1 V2.0

THESE

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(DIPLÔME D'ETAT)

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT
LE 26 JUILLET 2013
PAR

M. NJAMPA NKWETCHOUA

Né le 20 Mai 1988 à Yaoundé (Cameroun)

MEMBRE DU JURY

PRESIDENT: M. Bara NDIAYE : Professeur

MEMBRES: Mme Ndèye Coumba TOURE KANE : Professeur

M. Djibril FALL : Maitre de Conférences Agrégé

M. Gora MBAYE : Maitre de Conférences Agrégé

DIRECTEURS DE THESE: Mme Ndèye Coumba TOURE KANE : Professeur

Mme Halimatou DIOP-NDIAYE : Maitre-Assistant

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

**FACULTE DE MEDECINE DE PHARMACIE
ET D'ODONTOLOGIE**

DECANAT & DIRECTION

DOYEN	M. ABDARAHMANE DIA
PREMIER ASSESSEUR	M. AMADOU DIOUF
DEUXIEME ASSESSEUR	M. ABDOUL WAKHABE KANE
CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS	M. SEYBATOU MAGATTE NDAW

DAKAR, LE 03 JUIN 2013

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT PAR GRADE

ANNEE UNIVERSITAIRE 2012–2013

I. MEDECINE

PROFESSEURS TITULAIRES

M.	Mamadou	BA	Pédiatrie
M.	Mamadou	BA	Urologie
Mme	Mariame GUEYE	BA	Gynécologie-Obstétrique
M.	Serigne Abdou	BA	Cardiologie
M.	Seydou Boubakar	BADIANE	Neurochirurgie
M.	Boubacar	CAMARA	Pédiatrie
M.	Cheikh Ahmed Tidiane	CISSE	Gynécologie-Obstétrique
M.	Moussa Fafa	CISSE	Bactériologie-Virologie
§M.	Jean Marie	DANGOU	Anatomie et Cytologie Patho.
M.	Abdarahmane	DIA	Anatomie-Chirurgie Générale
Mme	Anta TAL	DIA	Médecine Préventive
M.	Baye Assane	DIAGNE	Urologie
+	*M.Ibrahima	DIAGNE	Pédiatrie
M.	Bay Karim	DIALLO	O.R.L
*M.	Mame Thierno	DIENG	Dermatologie
M.	Amadou Gallo	DIOP	Neurologie
M.	EL Hadj Malick	DIOP	O-R-L
M.	Saliou	DIOP	Hématologie Clinique
Mme	Thérèse MOREIRA	DIOP	Médecine Interne I
M.	Alassane	DIOUF	Gynécologie-Obstétrique
M.	Boucar	DIOUF	Néphrologie
Mme.	Elisabeth	DIOUF	Anesthésiologie-Réanimation
M.	Mamadou Lamine	DIOUF	Hépatologie / Gastro-Entérologie
M.	Raymond	DIOUF	O.R.L
M.	Souvasin	DIOUF	Orthopédie-Traumatologie
M.	Babacar	FALL	Chirurgie Générale
M.	Ibrahima	FALL	Chirurgie Pédiatrique
M.	Pape Ahmed	FALL	Urologie
Mme	Sylvie	SECK GASSAMA	Biophysique
Mme	Gisèle	WOTO GAYE	Anatomie Pathologique
M.	Oumar	GAYE	Parasitologie
§ M.	Lamine	GUEYE	Physiologie
*M.	Serigne Maguèye	GUEYE	Urologie
+*M.	Mamadou Mourtalla	KA	Médecine Interne
M.	Abdoul	KANE	Cardiologie
M.	Assane	KANE	Dermatologie
M.	Oumar	KANE	Anesthésie-Réanimation
M.	Jean Charles	MOREAU	Gynécologie-Obstétrique
M.	Abdoulaye	NDIAYE	Anatomie-Orthopédie-Trauma

M.	Issa	NDIAYE	O.R.L
*M.	Madoune Robert	NDIAYE	Ophtalmologie
M.	Mouhamadou	NDIAYE	Chirurgie Thoracique&Cardio-vasculaire
M.	Mouhamadou Mansour	NDIAYE	Neurologie
M.	Ousmane	NDIAYE	Pédiatrie
M.	Papa Amadou	NDIAYE	Ophtalmologie
M.	Alain Khassim	NDOYE	Urologie
*M.	Mamadou	NDOYE	Chirurgie Infantile
*M.	Abdou	NIANG	CM / Néphrologie
M.	El Hadji	NIANG	Radiologie
Mme	Mbayang	NDIAYE NIANG	Physiologie
*M.	Youssoupha	SAKHO	Neurochirurgie
M.	Mohamadou Guélaye	SALL	Pédiatrie
M.	Niama DIOP	SALL	Biochimie Médicale
M.	Abdoulaye	SAMB	Physiologie
M.	Mamadou	SARR	Pédiatrie
M.	Moustapha	SARR	Cardiologie
§Mme	Awa Marie COLL	SECK	Maladies Infectieuses
M.	Moussa	SEYDI	Maladies Infectieuses
M.	Seydina Issa Laye	SEYE	Orthopédie-Traumatologie
M.	EL Hassane	SIDIBE	Endocrinologie-Métabolisme Nutrition-Diabétologie
*M.	Masserigne	SOUMARE	Maladies Infectieuses
M.	Ahmad Iyane	SOW	Bactériologie-Virologie
M.	Mamadou Lamine	SOW	Médecine Légale
+* M	Papa Salif	SOW	Maladies Infectieuses
Mme.	Haby SIGNATE	SY	Pédiatrie
M.	Mouhamadou Habib	SY	Orthopédie-Traumatologie
§M	Cheickna	SYLLA	Urologie
*M.	Cheikh Tidiane	TOURE	Chirurgie Générale
M.	Meïssa	TOURE	Biochimie Médicale

+ Disponibilité

* Associé

§ Détachement

MAITRES DE CONFERENCES AGREGÉ

M.	Abdoulaye	BA	Physiologie
Mme	Aïssata	LY BA	Radiologie
M.	EL Hadj Amadou	BA	Ophthalmologie
M.	Momar Codé	BA	Neurochirurgie
M.	Mamadou Diarraah	BEYE	Anesthésie-Réanimation
M.	Mamadou Lamine	CISSE	Gynécologie-Obstétrique
M.	Ahmadou	DEM	Cancérologie
M.	Djibril	DIALLO	Gynécologie-Obstétrique
*+M.	Issakha	DIALLO	Santé Publique
M.	Saïdou	DIALLO	Rhumatologie
* M.	Babacar	DIAO	Urologie
M.	Maboury	DIAO	Cardiologie
*M.	Oumar	DIARRA	Chirurgie Thoracique & Cardio-Vasculaire
§ M.	Alassane	DIATTA	Biochimie Médicale
M.	Charles Bertin	DIEME	Orthopédie-traumatologie
M.	Madieng	DIENG	Chirurgie Générale
M.	Yémou	DIENG	Parasitologie
M.	El Hadj Ibrahima	DIOP	Orthopédie-Traumatologie
M.	Ibrahima Bara	DIOP	Cardiologie
M.	Mamadou	DIOP	Anatomie
M.	Saïd Norou	DIOP	Médecine Interne II
Mme.	Sokhna	BA DIOP	Radiologie
M.	Saliou	DIOUF	Pédiatrie
Mme	Awa Oumar	TOURE	Hématologie Biologique
M.	Babacar	FALL	Parasitologie
§ Mme	Mame Awa	FAYE	Maladies Infectieuses
M.	Oumar	FAYE	Parasitologie
M.	Oumar	FAYE	Histologie-Embryologie
M.	EL Hadj Fary	KA	Clinique Médicale/Néphrologie
M.	Ousmane	KA	Chirurgie Générale
M.	Abdoulaye	LEYE	Clinique Médicale / Médecine Interne
Mme	Fatimata	LY	Dermatologie
*M.	Mouhamadou	MBENGUE	Hépatologie / Gastro-Entérologie
§ M.	Mamadou	MBODJ	Biophysique
*M.	Claude	MOREIRA	Pédiatrie
M.	Philipe Marc	MOREIRA	Gynécologie
M.	Moustapha	NDIAYE	Neurologie
+ * M.	Papa	NDIAYE	Médecine Préventive
*M.	Souhaïbou	NDONGO	Médecine Interne
*M.	Cheikh Tidiane	NDOUR	Maladies Infectieuses
M.	Jean Marc Ndiaga	NDOYE	Anatomie
Mme	Marie	DIOP NDOYE	Anesthésie-Réanimation
M.	Oumar	NDOYE	Biophysique
M.	Gabriel	NGOM	Chirurgie Pédiatrique
Mme	Suzanne Oumou	NIANG	Dermatologie
M.	Abdoulaye	POUYE	CM / Médecine Interne
Mme	Paule Aïda	NDOYE	Ophthalmologie

M.	André Daniel	SANE	Orthopédie-Traumatologie
Mme	Fatou Samba D. NDIAYE	SENE	Hématologie Clinique
M.	Abdourahmane	TALL	O.R.L
M.	Mamadou Habib	THIAM	Psychiatrie

+ Disponibilité

* Associé

§ Détachement

MAITRES-ASSISTANTS

Mme	Fatou Diallo	AGNE	Biochimie Médicale
Mme	Ndèye Méry DIA	BADIANE	Maladies Infectieuses
M.	El Hadj Souleymane	CAMARA	Orthopédie-Traumatologie
M.	Amadou Gabriel	CISS	Chirurgie Thoracique & Cardio. Vasc.
Mme.	Mariama Safiétoú	KA CISSE	Médecine Interne
M.	Mamadou	CISSE	Chirurgie Générale
M.	André Vauvert	DANSOKHO	Orthopédie-Traumatologie
M.	Daouda	DIA	Hépatologie / Gastro-Entérologie
Mme	Ndèye Ramatoulaye	DIAGNE	Pédiatrie
M.	Abdoulaye Séga	DIALLO	Histologie-Embryologie
*Mme	Marie Edouard Faye	DIEME	Gynécologie Obstétrique
M.	Abdoulaye Ndoye	DIOP	Radiodiagnostic
M.	Pape Saloum	DIOP	Chirurgie Générale
M.	Sylvie Audrey G.	DIOP	Maladies Infectieuses
M.	Ansoumana	DIATTA	Pneumophysiologie
M.	Amadou Lamine	FALL	Pédiatrie
M.	Lamine	FALL	Pédopschyatrie
Mme	Mame Coumba GAYE	FALL	Médecine du Travail
M.	Papa Lamine	FAYE	Psychiatrie
*M.	Serigne Modou Kane	GUEYE	Gynécologie-Obstétrique
M.	Adama	KANE	Cardiologie
Mme	Yacine Dia	KANE	Pneumophysiologie
*M.	Abdoul Aziz	KASSE	Cancérologie
M.	Ibrahima	KONATE	Chirurgie Générale
M.	Noël Magloire	MANGA	Maladies Infectieuses
M.	Alassane	MBAYE	Cardiologie
Mme	Aminata	DIACK MBAYE	Pédiatrie
M.	Magatte	MBAYE	Gynécologie-Obstétrique
Mme	Ndèye Maïmouna NDOUR	MBAYE	Médecine Interne
M.	Amadou Koura	NDAO	Neurologie
M.	Assane	NDIAYE	Anatomie
M.	Jean Louis Abdourahim	NDIAYE	Parasitologie Médicale
* M.	Malick	NDIAYE	O.R.L.
M.	Mor	NDIAYE	Médecine du Travail
M.	Mouhamadou Bamba	NDIAYE	Cardiologie
M.	Ndaraw	NDOYE	Neurochirurgie
M.	Lamine	NIANG	Urologie

Mme	Marguerite Edith D.	QUENUM	Ophthalmologie
M.	Jean Claude François	SANE	Orthopédie-Traumatologie
Mme	Anne Aurore	SANKALE	Chirurgie plastique et reconstructive
Mme	Anna	SARR	Médecine Interne
Mme	Fatou Bintou	SAR SARR	Physiologie
M.	Ndéné Gaston	SARR	Biochimie Médicale
M.	Gora	SECK	Physiologie
*M.	Ibrahima	SECK	Médecine Préventive
M.	Mohamed Maniboliot	SOUMAH	Médecine légale
Mme	Aïda	SYLLA	Psychiatrie
M.	Assane	SYLLA	Pédiatrie
M.	Kamadore	TOURE	Santé Publique
Mme	Nafissatou Oumar	TOURE	Pneumologie
M.	Silly	TOURE	Stomatologie
Mme	Aïssatou Magatte	WANE	Ophthalmologie
M.	Issa	WONE	Médecine Préventive

ASSISTANTS

Mme	Nafissatou Ndiaye	BA	Anatomie Pathologique
M.	El Hadji Amadou Lamine	BATHILY	Biophysique
Mme	Fatou	CISSE	Biochimie Médicale
M.	Boubacar Samba	DANKOKO	Médecine Préventive
M.	Mouhamadou Lamine	DIA	Bactériologie-Virologie
M	Sidy Akhmed	DIA	Médecine du Travail
M.	Chérif Mohamed M.	DIAL	Anatomie Pathologique
Mme.	Awa Ba	DIALLO	Bactériologie-Virologie
Mme.	Mama SY	DIALLO	Histologie-embryologie
M.	Mor	DIAW	Physiologie
Mme.	Marie Joseph	DIEME	Anatomie Pathologique
M.	Abdoulaye Dione	DIOP	Radiologie
Mme.	Aïssatou Seck	DIOP	Physiologie
M.	Dialo	DIOP	Bactériologie-Virologie
M.	Ousseynou	DIOP	Biophysique
Mme.	Abibatou	SALL FALL	Hématologie
M.	Blaise Félix	FAYE	Hématologie
Mme	Roughyatou	KA	Bactériologie – Virologie
M.	Mamadou Makhtar Mbacké	LEYE	Médecine Préventive
M.	Aïnina	NDIAYE	Anatomie
M.	Boucar	NDONG	Biophysique
M.	Khadim	NIANG	Médecine Préventive
M.	Moussa	SECK	Hématologie
M.	Doudou	SOW	Parasitologie Médicale
M.	Khadim	SYLLA	Parasitologie Médicale
M.	Ibou	THIAM	Anatomie Pathologique
M.	Roger Clément Kouly	TINE	Parasitologie Médicale

CHEFS DE CLINIQUE-ASSISTANTS DES SERVICES UNIVERSITAIRES DES HOPITAUX

M.	Idrissa	BA	Pédopsychiatrie
Mme	Aïssatou	BA	Pédiatrie
M.	Papa Salmane	BA	Chirurgie Thoracique & Cardio -vasculaire
M.	Mamadou Diawo	BAH	Anesthésie-Réanimation
Mlle.	Marie Louise	BASSENE	Hépato-gastroentérologie
M.	Malick	BODIAN	Cardiologie
M.	Momar	CAMARA	Psychiatrie
M	Mouhamadou Moustapha	CISSE	Néphrologie
Mme	Ndèye Fatou	COULIBALY	Orthopédie-Traumatologie
M.	Mamadou	COUME	Médecine Interne
M.	Abdoulaye	DANFA	Psychiatrie
M.	Richard Edouard Alain	DEGUENONVO	O-R-L
M.	Mohamed Tété Etienne	DIADHIOU	Gynécologie-Obstétrique
Mme.	Nafissatou	DIAGNE	Médecine Interne
M.	Ngor Side	DIAGNE	Neurologie
M.	Moussa	DIALLO	Dermatologie
M.	Demba	DIEDHIOU	Médecine Interne II
Mme	Mame Salimata	DIENE	Neurochirurgie
*M.	Mamadou Moustapha	DIENG	Cancérologie
M.	Pape Adama	DIENG	Chirurgie Thoracique & Cardio-Vasculaire
Mme.	Seynabou FALL	DIENG	Médecine Interne I
Melle.	Evelyne Siga	DIOM	O.R.L.
M.	Rudolph	DIOP	Stomatologie
M	Assane	DIOP	Dermatologie
M.	Abdoul Aziz	DIOUF	Gynécologie-Obstétrique
M.	Assane	DIOUF	Maladies Infectieuses
M.	Doudou	DIOUF	Cancérologie
M.	Boubacar	FALL	Urologie
M.	Mohamed Lamine	FALL	Anesthésie-réanimation
Mm.	Anna Modji Basse	FAYE	Neurologie
M.	Atoumane	FAYE	Médecine Interne
*M.	Papa Moctar	FAYE	Pédiatrie
Mme.	Louise	FORTES	Maladies Infectieuses
M.	Pape Macoumba	GAYE	Cancéro-radiothérapie
M.	Modou	GUEYE	Pédiatrie
M.	Aly Mbara	KA	Ophthalmologie
M.	Daye	KA	Maladies Infectieuses
M.	Amadou Ndiassé	KASSE	Orthopédie-Traumatologie
M.	Charles Valérie Alain	KINKPE	Orthopédie-Traumatologie
Melle.	Ndèye Aïssatou	LAKHE	Maladies Infectieuses
M.	Ahmed Tall	LEMRABOTT	Néphrologie
M.	Papa Alassane	LEYE	Anesthésie-réanimation
M.	Yakham Mohamed	LEYE	Médecine Interne
Mme.	Indou DEME	LY	Pédiatrie
M.	Lamine	NDIAYE	Chirurgie Plastique et Reconstructive
M.	Maodo	NDIAYE	Dermatologie

M.	Papa Ibrahima	NDIAYE	Anesthésie Réanimation
Mme	Ndèye Dialé Ndiaye	NDONGO	Psychiatrie
M.	Oumar	NDOUR	Chirurgie Pédiatrique
M.	Cyrille	ZE ONDO	Urologie
M.	Aloïse	SAGNA	Chirurgie Pédiatrique
Mme.	Magatte Gaye	SAKHO	Neurochirurgie
M.	Alioune	SARR	Urologie
Mme	Lala Bouna	SECK	Neurologie
M.	Sokhna	SECK	Psychiatrie
Mme.	Marième Soda	DIOP SENE	Neurologie
M.	Abdou Khadir	SOW	Physiologie
M.	Aboubacry Sadikh	SOW	Ophtalmologie
Melle	Adjaratou Dieynabou	SOW	Neurologie
M.	Djiby	SOW	Médecine Interne II
M.	Yaya	SOW	Urologie
M.	Abou	SY	Psychiatrie
M.	Alioune Badara	THIAM	Neurochirurgie
Mme.	Khady	THIAM	Pneumologie
M.	Mbaye	THIOUB	Neurochirurgie
M.	Alpha Oumar	TOURE	Chirurgie Générale

+ Disponibilité

* Associé

§ Détachement

II. PHARMACIE

PROFESSEURS TITULAIRES

M.	Emmanuel	BASSENE	Pharmacognosie et Botanique
M.	Cheikh Saad Bouh	BOYE	Bactériologie-Virologie
M.	Aynina	CISSE	Biochimie Pharmaceutique
Mme	Aïssatou Gaye	DIALLO	Bactériologie-Virologie
Mme	Aminata SALL	DIALLO	Physiologie Pharmaceutique
M.	Mounibé	DIARRA	Physique Pharmaceutique
M.	Alioune	DIEYE	Immunologie
* M.	Amadou Moctar	DIEYE	Pharmacologie et Pharmacodynamie
M.	Pape Amadou	DIOP	Biochimie Pharmaceutique
M.	Yérim Mbagnick	DIOP	Chimie Analytique
M.	Amadou	DIOUF	Toxicologie
*M.	Souleymane	MBOUP	Bactériologie-Virologie
M.	Bara	NDIAYE	Chimie Analytique
* M.	Omar	NDIR	Parasitologie
Mme.	Philomène LOPEZ	SALL	Biochimie Pharmaceutique
M.	Guata yoro	SY	Pharmacologie et Pharmacodynamie

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Melle	Thérèse	DIENG	Parasitologie
M.	Tandakha Ndiaye	DIEYE	Immunologie
M.	Djibril	FALL	Pharmacie Chimique & Chimie Orga.
M.	Mamadou	FALL	Toxicologie
M.	Daouda	NDIAYE	Parasitologie
Mme.	Maguette D.	SYLLA NIANG	Immunologie
M.	Mamadou	SARR	Physiologie Pharmaceutique
M.	Oumar	THIOUNE	Pharmacie Galénique
M.	Alassane	WELE	Chimie Thérapeutique

MAITRES DE CONFERENCES

M.	Matar	SECK	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
----	-------	------	--

MAITRES-ASSISTANTS

Mme.	Rokhaya Ndiaye	DIALLO	Biochimie Pharmaceutique
M.	Amadou	DIOP	Chimie Analytique
M.	Pape Madième	GUEYE	Biochimie Pharmaceutique
M.	Modou Oumy	KANE	Physiologie
M.	Gora	MBAYE	Physique Pharmaceutique
*M.	Augustin	NDIAYE	Physique Pharmaceutique

*Mme Halimatou Diop	NDIAYE	Bactériologie – Virologie
*M. Mamadou	NDIAYE	Pharmacologie et Pharmacodynamie
Mme Rita B.	NONGONIERMA	Pharmacognosie
M. Serigne Omar	SARR	Chimie Analytique & Bromatologie
Mme. Awa Ndiaye	SY	Pharmacologie

ASSISTANTS

Melle Aïda Sadikh	BADIANE	Parasitologie
Mme Kady Diatta	BADJI	Botanique
M. Mamadou	BALDE	Chimie Thérapeutique
*M Firmin Sylva	BARBOZA	Pharmacologie et Pharmacodynamie
M. Makhtar	CAMARA	Bactériologie-virologie
M. William	DIATTA	Botanique
M. Adama	DIEDHIOU	Chimie Thérapeutique & Organique
M. Cheikh	DIOP	Toxicologie
M. Ahmédou Bamba K.	FALL	Pharmacie Galénique
M. Alioune Dior	FALL	Pharmacognosie
*M. Babacar	FAYE	Chimie Générale
M. Djiby	FAYE	Pharmacie Galénique
M. Macoura	GADJI	Hématologie
Mme. Rokhaya Sylla	GUEYE	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
M. Babacar	MBENGUE	Immunologie
Mme Arame	NDIAYE	Biochimie Médicale
M. Mouhamadou	NDIAYE	Parasitologie
M. Idrissa	NDOYE	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
Mme. Mathilde M. P. Cabral	NDIOR	Toxicologie
M. Abdoulaye	SECK	Bactériologie –Virologie
* M. Mame Cheikh	SECK	Parasitologie
M. Mbaye	SENE	Physiologie Pharmaceutique
M. Madièye	SENE	Pharmacologie
Mme. Fatou Guèye	TALL	Biochimie Pharmaceutique
Mme Aminata	TOURE	Toxicologie

ATTACHES

M. Louis Augustin D.	DIOUF	Physique Pharmaceutique
----------------------	-------	-------------------------

* Associé

II. CHIRURGIE DENTAIRE

PROFESSEURS TITULAIRES

*M.	Falou	DIAGNE	Orthopédie Dento-Faciale
M.	Boubacar	DIALLO	Chirurgie Buccale
M.	Papa Demba	DIALLO	Parodontologie
M	Malick	SEMBENE	Parodontologie

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mme	Khady DIOP	BA	Orthopédie Dento-Faciale
M	Henri Michel	BENOIST	Parodontologie
Mme	Adam Marie	SECK DIALLO	Parodontologie
M.	Daouda	FAYE	Odontologie Préventive et Sociale
M.	Abdoul Wakhabe	KANE	Odontologie Cons. Endodontie
§ Mme	Charlotte	FATY NDIAYE	Chirurgie Buccale
Mme	Fatou gaye	NDIAYE	Odontologie Conservatrice Endodontie
* M.	Papa Ibrahima	NGOM	Orthopédie Dento-Faciale
Mme	Soukèye	DIA TINE	Chirurgie Buccale
M.	Babacar	TOURE	Odontologie Conservatrice Endodontie

MAITRES ASSISTANTS

Mme	Aïssatou	TAMBA BA	Pédodontie-Prévention
M.	Daouda	CISSE	Odontologie Prév. et Sociale
Mme	Fatou	DIOP	Pédodontie-Prévention
M.	Joseph Samba	DIOUF	Orthopédie Dento-Faciale
M.	Babacar	FAYE	Odontologie Cons. Endodontie
M.	Malick	FAYE	Pédodontie
Mme	Fatou	LEYE	O.C.E.
M.	Cheikh Mouhamadou M.	LO	Odontologie Prév. Sociale
M.	Malick	MBAYE	Odontologie Cons. Endodontie
M.	El Hadj Babacar	MBODJ	Prothèse Dentaire
M.	Paul Débé Amadou	NIANG	Chirurgie Buccale
Mme	Farimata youga DIENG	SARR	Matières Fondamentales
M.	Mouhamed	SARR	Odontologie Cons. Endodontie
M.	Mohamed Talla	SECK	Prothèse Dentaire

ASSISTANTS

Mme.	Adjaratou Wakha	AIDARA	O.C.E.
M.	Abdou	BA	Chirurgie Buccale
M	Alpha	BADIANE	Orthopédie Dento-Faciale
M.	Khaly	BANE	O.C.E.
Mme	Binetou C.	GASSAMA BARRY	Chirurgie Buccale
*M.	Khalifa	DIENG	Odontologie Légale
*M.	Lambane	DIENG	Prothèse Dentaire
M.	Abdoulaye	DIOUF	Parodontologie
M.	Massamba	DIOUF	Odontologie Prév. et Sociale
Mme	Ndèye Nguiniane Diouf	GAYE	Odontologie Pédiatrique
*M.	Moctar	GUEYE	Prothèse Dentaire
*M.	Mouhamadou Lamine	GUIRASSY	Parodontologie
Melle.	Aïda	KANOUTE	Santé Publique Dentaire
M.	Alpha	KOUNTA	Chirurgie Buccale
M.	Papa Abdou	LECOR	Anatomo- Physiologie
M.	Edmond	NABHANE	Prothèse Dentaire
M.	Cheikh	NDIAYE	Prothèse Dentaire
M.	Oumar Harouna	SALL	Matières Fondamentales
M.	Babacar	TAMBA	Chirurgie Buccale
M.	Amadou	TOURE	Prothèse Dentaire
M.	Saïd Nourou	TOURE	Prothèse Dentaire

—
* Associé

§ Détachement

**AU SEIGNEUR DIEU, LE TOUT PUISSANT
POUR SA GRÂCE ET SON AMOUR MANIFESTE
PAR SON FILS JÉSUS CHRIST.**

JE DÉDIE CE TRAVAIL...

A mon père **NKWETCHOUA SIMÉON**, qui n'a pas été là pendant mon cursus, qui n'est pas encore en ce jour où je concrétise mon cursus de Pharmacie et qui ne sera pas encore là pour tout. Merci encore pour cet enseignement que tu m'as donné très jeune, ce qui m'a permis en grande partie d'être là où je suis.

A ma mère **NKWETCHOUA MADELEINE**, pour ton amour, ta sagesse et ton savoir m'a été d'une grande utilité et seront encore pour l'avenir. Reçois dans ce travail ma gratitude et l'aboutissement de tes nombreux efforts consentis dans mon éducation. Je voudrais juste te dire merci encore pour tous. Je t'aime la Mère !!!

A mon frère **FENDO NKWETCHOUA FRIDOLIN**, pour tes conseils et tes encouragements à mon égard. Reçois encore ma gratitude et mon affection à travers ce fruit de six années de travail.

A mon frère **MBATCHOU NKWETCHOUA GUY**, encore pour ces discussions et échanges qui m'ont permis souvent d'être avant-gardiste mais plus de sentir la présence d'un aîné. Reçois encore ma gratitude et mon affection à travers ce fruit de six années de travail.

A mes frères : **NGANWA NKWETCHOUA AUGUSTIN, NDODJANG NKWETCHOUA BERTIN, NAMBA NKWETCHOUA CHRISTIAN ET NZEUGA NKWETCHOUA WILLIAM**.

Merci encore pour tous ces moments passés ensemble notamment dans notre tendre enfance. Recevez à travers ce travail, mes encouragements et quel que soit la tâche, si âpre qu'elle soit, gardons toujours l'enthousiasme.

A mes cousins, **DR CHRISTIAN ET DR NADÈGE** avec qui j'ai passé de bons moments à Dakar. Je vous dis merci pour les encouragements transmis par vos enthousiasmes à la tâche qui m'ont émeus. Recevez encore ma gratitude et mon affection.

A mon gars de toujours **TCHASSOM WAYA ARIEL**, pour ces échanges et encouragements. Reçois mes encouragements et que ce travail soit un élément qui enthousiasmera ton esprit scientifique.

A tous ce qui ont de près ou de loin participé à la réalisation de ce travail plus particulièrement à **YANNICK MBIAPA** et à **DAHLIA**.

REMERCIEMENTS...

Tout d'abord, je tiens à remercier le **PR SOULEYMANE MBOUP**, Chef du Laboratoire de Bactériologie Virologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec, pour ses efforts réalisés dans la recherche, ce qui m'a permis de trouver un socle viable pour ma formation ainsi que pour les générations futures au sein du laboratoire. Monsieur le Professeur, nous vous exprimons nos sentiments les plus respectueux.

Je tiens également à remercier le **PROFESSEUR NDÈYE COUMBA TOURÉ KANE** pour son accueil chaleureux et pour l'opportunité qu'elle nous a offerte en acceptant de diriger ce travail.

Nous sommes heureux d'avoir pu bénéficier de vos conseils et de votre encadrement tout le long de notre travail, depuis le choix du sujet jusqu'à notre soutenance en passant par la rédaction de notre thèse et la réalisation de nos expériences. C'est un honneur pour nous d'avoir été guidés par votre savoir et votre richesse professionnelle.

Malgré vos multiples occupations, vous avez œuvré sans relâche pour que nous en arrivions à terme de ce travail. Je vous en remercie sincèrement. Les mots ne pourront exprimer ma gratitude.

La réalisation de ce travail nous a permis de mieux connaître le Grand Maître que vous êtes, et de découvrir votre modestie et votre allure maternelle que nous respectons infiniment.

Veuillez trouver ici l'expression de notre gratitude et de notre profond attachement.

Je remercie le **DOCTEUR HALIMATOU DIOP NDIAYE** pour ses encouragements, son soutien, et les conseils précieux qu'elle m'a fournis tout au long de notre travail.

Ce travail n'aurait pu porter ses fruits sans votre aide précieuse. Votre implication, vos efforts continus et votre patience ont permis la réussite de ce travail.

Il est certain que j'ai beaucoup appris en travaillant avec vous ; votre rigueur et vos compétences sont pour moi un exemple à suivre.

J'ai pu découvrir en vous, au-delà de vos qualités scientifiques et pédagogiques, des qualités morales que nous respectons et estimons profondément.

Que ce travail soit le témoignage de ma profonde gratitude.

Je remercie **SADA DIALLO** pour son accueil, son encadrement technique et son expérience qu'il m'a fournis pendant notre expérimentation. Grâce à vous, j'ai appris à être optimiste et à trouver des solutions. Par ta patience et à ta méthodologie particulière, j'ai vite comblé mes lacunes et me mettre au pas. Je te suis grandement reconnaissant !!!

Au **DOCTEUR KARAM FARBA**, à qui je témoigne toute ma reconnaissance. Ton soutien moral et ces discussions m'ont été d'une grande aide.

A **OUSSEYNOU NDIAYE**, dont l'aide m'a été précieuse lors de l'échantillonnage. Merci pour ce geste de sympathie et d'amitié.

A **A.A.M. DIOUARRA**, pour son aide lors de la rédaction de ce document. Merci pour ce geste de sympathie et d'amitié.

A toutes les personnes que j'ai côtoyées quotidiennement au laboratoire de biologie moléculaire de l'Hôpital Aristide Le Dantec, je vous remercie énormément pour votre support aussi bien technique que moral. Grâce à votre sympathie et à l'ambiance familiale qui règne au laboratoire, toutes les difficultés rencontrées ont été surmontées. Je vous en remercie du fond du cœur.

Mes sincères remerciements à **HUGUETTE ENDALLE**, qui est une grande sœur, pour son aide et sa formation.

A toute la **TEAM 237 DE LA FMPO** de DAKAR, plus particulièrement à celle de Samedi soir.

A NOS MAÎTRES ET JUGES...

A Notre maître et Président de Jury,

Le Professeur Bara NDIAYE

Nous vous sommes infiniment reconnaissants pour le grand honneur et le privilège que vous nous faites en acceptant de présider la soutenance de notre thèse.

Votre sollicitude, votre courtoisie et votre compétence font de vous un grand maître de cette faculté.

Nous vous prions d'accepter, monsieur le professeur, l'expression de notre profonde et respectueuse gratitude.

A Notre maître et directeur de Thèse,

Le Professeur Ndèye Coumba Toure Kane

La spontanéité avec laquelle vous avez accepté de diriger ce travail, malgré vos multiples occupations, nous touche profondément.

Nous ne saurions vous exprimer à sa juste valeur notre reconnaissance pour tout ce que vous avez réalisé à l'endroit de notre modeste personne.

Votre rigueur scientifique, votre grandeur d'esprit, votre gentillesse, et votre modestie sont autant de qualités qui suscitent le respect et l'admiration.

Veuillez trouver ici, cher maître, nos vifs remerciements et notre profonde gratitude.

A Notre maître et juge,

Le Professeur Djibril FALL

Permettez-nous de vous exprimer notre gratitude pour l'honneur que vous nous faites en acceptant de siéger dans notre jury.

Tout au long de notre cursus universitaire, vous nous avez toujours fait bénéficier de votre grande culture scientifique ainsi que de vos qualités humaines qui font de vous une référence.

Trouvez ici, cher maître, l'expression de notre reconnaissance éternelle.

A Notre maître et juge,
Le Professeur Gora MBAYE

La spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail nous a beaucoup marqué.
Votre disponibilité, votre compétence et vos éminentes qualités intellectuelles font de vous un maître estimé et respecté par tous.

C'est un honneur pour nous de pouvoir profiter de votre expérience professionnelle et de vos connaissances qui nous aideront à parfaire ce manuscrit.

Qu'il nous soit permis, cher maître, de vous exprimer notre plus haute considération.

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

**LISTE DES
ABREVIATIONS ET
ACRONYMES**

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AES : Accidents d'exposition au sang

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : Acide Ribonucléique Messager

ARV : Antirétroviraux

AZT : Zidovudine

CA : Capside

CD4+ : Classe de Différenciation 4 exprimée

CDC : Center for Diseases Control and Prevention

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CNLS : Comité National de Lutte contre le SIDA

CRCF : Centre régional de recherche et de formation

CRFs : Circulating Recombinant Forms

CS : Centre de Santé

CTL : Cytotoxic T Leucocysts

CVP : Charge Virale Plasmatique

DBS : Dried Blood Spots

DPS : Dried Plasma Spots

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique

ELISA : Enzym Lynked Immuno-Sorbent Assay

Env : enveloppe

Gag : Gène des Antigènes de Groupe

Gp : Glycoprotéine

HALD : Hôpital Aristide LeDantec

HSH : Hommes ayant des Relations sexuelles avec d'autres Hommes

HTLV III: Human T Leukemia Virus 3

HTLV IV: Human T Leukemia Virus 4

IF : Inhibiteurs de Fusion

IIN : Inhibiteurs de l'Intégrase

IN : Intégrase

INNTI : Inhibiteurs Non nucléosidiques de la transcriptase inverse

INTI : Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse

IP : Inhibiteurs de la Protéase

ISAARV : Initiative Sénégalaise d'Accès aux Antirétroviraux

IST : Infections sexuelles transmissibles

IV : Intraveineuse

LAV : Lymphadenopathy Associated Virus

LAV-2 : Lymphadenopathy Associated Virus 2

LCR : Liquide Céphalorachidien

LIA : Line Immune Assay

log : logarithme décimale

LT : Lymphocyte T

MA: Matrice

MSM: Men have Sex with Men

NASBA: Nucleic Acid Sequenced Base Amplification

NC: Nucleocapside

Nef: Negative expression factor

OMS : Organisation mondiale de la santé

ORFs: Open Reading Frames

P15: Protéine 15

P17: Protéine 17

P24: Protéine 24

P55 : Protéine 55

PCR : Polymerase Chain Reaction

PEC : Prise en charge

Pol : Polymerase

PR : Protease

PVVIH : Personnes Vivant avec le VIH

RARS : Réseau Africain de Recherche sur le SIDA

Rev: Regulation of expression viral

RIBA: Recombinant ImmunoBlot Assay

RIPA : Radio Immuno Precipitation Assay

RT : Reverse Transcriptase

SIDA : Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquise

TARV : Traitement Antirétroviral

tat : Transactivator of transcription

Tat : Transactivation of transcription

TI : Transcriptase Inverse

TME : Transmission Mère-Enfant

URFs : Unique Recombinants Forms

Vif : Virion Infectivity Factor

VIH : Virus de l'Immunodéficiency Humaine

VIH-1 : Virus de l'Immunodéficiency Humaine 1

VIH-2 : Virus de l'Immunodéficiency Humaine 2

Vpr : Viral protein R

Vpu : Viral protein U

Vpx : Viral protein X

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Répartition des échantillons en fonction de la CVP	54
Tableau II : Différences de log entre Plasma et les différents volumes sur DBS	55
Tableau III : Répartition des échantillons en fonction des $\Delta\log$ Plasma vs DBS en valeur absolue	55
Tableau IV : Répartition des différences de log en valeur absolue entre les DBS en fonction de leur concordance	59
Tableau V : Répartition des DBS présentant des discordances en fonction des valeurs log de CVP.....	59

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure du VIH http://commons.wikimedia.org/wiki/File:HIV_Virion-fr.svg	6
Figure 2 : Schéma du génome VIH-1 ⁽⁸⁴⁾	9
Figure 3 : Schéma de la fixation (3a) et de l'entrée du VIH (3b)	14
Figure 4 : Schéma de la transcription inverse	15
Figure 5 : Schéma de l'intégration	15
Figure 6 : Schéma de la transcription (6a) et de la traduction (6b) du génome viral	16
Figure 7 : Assemblage et bourgeonnement des nouveaux virions ⁽¹¹³⁾	16
Figure 8 : Evolution des marqueurs biologiques au cours de l'infection. ⁽⁸¹⁾	19
Figure 9 : Evolution des sites de PEC ⁽⁴⁾	34
Figure 10 : Evolution du niveau de décentralisation de patients sous ARV ⁽⁴⁾	34
Figure 11 : Taux de couverture de mise sous ARV des PVVIH ⁽⁴⁾	35
Figure 12 : Photographies des cartes de DBS avec les différents volumes déposés	45
Figure 13 : Photographie d'un sac zippé prêt pour la conservation ou pour l'envoi	46
Figure 14 : Photographie des tubes de lyse sur l'agitateur horizontal	47
Figure 15 : Schéma de l'extraction sur Nuclisens EasyMAG	48
Figure 16 : Principe de la réaction d'amplification par NASBA	50
Figure 17 : Principe de la détection par les balises moléculaires	51
Figure 18 : Droite Régression et Bland-Altman Plasma <i>vs</i> DBS_50	56
Figure 19 : Droite de régression et Bland-Altman Plasma <i>vs</i> DBS_75	57
Figure 20 : Droite de régression et Bland-Altman Plasma <i>vs</i> DBS_100	57
Figure 21 : Droite de régression et Bland-Altman Plasma <i>vs</i> DBS_150	58
Figure 22 : Droite de régression et Bland-Altman DBS_50 <i>vs</i> DBS_75	60
Figure 23 : Droite de régression et Bland-Altman DBS_50 <i>vs</i> DBS_100	60
Figure 24 : Droite de régression et Bland-Altman DBS_50 <i>vs</i> DBS_150	61
Figure 25 : Droite de régression et Bland-Altman DBS_75 <i>vs</i> DBS_100	62
Figure 26 : Droite de régression DBS_50 <i>vs</i> DBS_150	62
Figure 27 : Droite de régression et Bland-Altman DBS_100 <i>vs</i> DBS_150	63

INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : GENERALITES SUR L'INFECTION A VIH/SIDA	
Chapitre I : L'infection à VIH/SIDA	4
1. HISTORIQUE DE L'INFECTION A VIH/SIDA	4
2. BIOLOGIE ET TAXONOMIE DU VIH-1	5
2.1. Définition et classification du VIH-1	5
2.2. Morphologie et structure du VIH-1.....	5
2.3. Organisation génomique du VIH-1	8
2.3.1. Les gènes de structure	9
2.3.2. Les gènes de régulation et les gènes accessoires	11
2.3.3. Les LTR	12
2.4. La variabilité génétique du VIH-1	13
2.5. Le cycle répliquatif du VIH-1	14
2.6. Le tropisme du VIH-1	17
3. Physiopathologie de l'infection à l'infection à VIH-1.....	17
3.1. La phase de primo-infection	18
3.2. La phase de latence clinique	18
3.3. La phase symptomatique aboutissant au SIDA.....	19
4. Modes de transmission	20
4.1. Transmission horizontale	20
4.1.1. Par voie sexuelle	20
4.1.2. Par voie sanguine	21
4.2. Transmission verticale	22
5. Epidémiologie	24
5.1. Aperçu mondial.....	24
5.2. En Afrique Subsaharienne	24
5.3. Au Sénégal	25
6. Diagnostic biologique.....	26

6.1.	Diagnostic indirect	26
6.1.1.	Tests de dépistage	26
6.1.2.	Tests de confirmation.....	26
6.2.	Diagnostic direct	27
6.2.1.	Détection de l'Ag P24.....	27
6.2.2.	Isolement du VIH par culture cellulaire.....	27
6.2.3.	Détection des acides nucléiques viraux.....	28
Chapitre II : Traitement de l'infection à VIH.....	30	
1.	Les molécules antirétrovirales	30
1.1.	Les inhibiteurs nucléosidiques de la reverse transcriptase.....	30
1.2.	Les inhibiteurs non nucléosidiques de la reverse transcriptase.....	30
1.3.	Les inhibiteurs de protéases (IP)	31
1.4.	Les inhibiteurs de fusions et d'entrée (IF et IE).....	31
1.5.	Les inhibiteurs de l'intégrase (IIN)	31
2.	Le traitement	31
3.	Prise en Charge des PVVIH au Sénégal.....	32
3.1.	Présentation de l'ISAARV	32
3.1.1.	Historique.....	32
3.1.2.	Réalisations jusqu'à ce jour	33
3.2.	Prise en charge des PVVIH.....	35
3.3.	Utilisation du papier buvard comme support de prélèvement	36
DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL		
Chapitre I : Contexte, Justificatifs et Objectifs de l'Etude		36
1.	Contexte et Justificatifs de l'étude.....	37
2.	Objectifs de l'Etude	2
2.1.	Objectif général.....	2
2.2.	Objectifs spécifiques	2
Chapitre II : Matériel et Méthodes.....		40
1.	Type d'étude	40

2. Cadre de l'étude	40
3. Echantillonnage.....	43
4. Matériel.....	43
4.1. Matériel d'usage général.....	43
4.2. Réactifs et équipements pour la technologie Nuclisens EasyQ HIV-1 V 2.0	44
4.2.1. Extraction.....	44
4.2.2. Amplification et détection.....	44
5. Méthodologie de l'étude	45
5.1. Vérification de l'identification et attribution d'un numéro	45
5.2. Préparation des spots et conservation	45
5.3 Séparation lymphocytaire et conservation	46
5.4 Découpe des DBS et lyse	46
5.5. Extraction – Amplification et détection par la technologie Nuclisens EasyQ HIV-1 V2.0.....	48
5.5.1. Extraction des acides nucléiques sur l'automate EasyMAG.....	48
5.5.2. Amplification et détection par la technologie Nuclisens EasyQ HIV-1 V2.0.....	49
6. Analyse statistique des résultats	52

TROISIEME PARTIE : EXPLOITATION DES RESULTATS

Chapitre I : Résultats.....	54
1. Résultats de la charge virale plasmatique	54
2. Comparaison globale des valeurs de CVP avec les DBS	54
3. Analyse des discordances plasma DBS vs en fonction des valeurs de CVP	55
4. Droite de régression linéaire et concordance plasma vs DBS	56
4.1. Régression linéaire et concordance Plasma vs DBS_50	56
4.2. Régression linéaire et concordance Plasma vs DBS_75	56
4.3. Régression linéaire et concordance Plasma vs DBS_100	57
4.4. Régression linéaire et concordance Plasma vs DBS_150	58
5. Comparaison des valeurs de charge virale obtenues sur DBS.....	58
6. Analyse des discordances DBS vs DBS en fonction des valeurs de CVP	59
7. Droite de régression linéaire et concordance entre les prélèvements DBS.....	59

7.1.	Régression linéaire et concordance DBS_50 vs DBS_75	59
7.2.	Régression linéaire et concordance DBS_50 vs DBS_100	60
7.3	Droite de régression linéaire et concordance DBS_50 vs DBS_150	61
7.4.	Régression linéaire et concordance DBS 75 vs DBS 100	61
7.5.	Droite de régression linéaire DBS 75 vs DBS 150	62
7.6.	Ligne de régression linéaire DBS_100 vs DBS_150	63

Discussion

1.	Utilisation du papier buvard et de la technologie NucliSENS	64
2.	La méthodologie	66
3.	Les résultats	66
3.1.	Plasma <i>vs</i> DBS	66
3.2.	DBS <i>vs</i> DBS	67

CONCLUSION

Références bibliographiques	71
--	-----------

Annexe 1

INTRODUCTION

Plus de trente ans après sa découverte, malgré les progrès considérables enregistrés, le virus de l'immunodéficience humaine responsable de la pandémie du Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquise (SIDA), constitue la 3^{ème} cause de mortalité dans les pays à faibles revenus. Ce fléau demeure un challenge pour la communauté scientifique, malgré les campagnes de prévention et de sensibilisation menées jusque-là. L'ONUSIDA en 2012, estime à 34,2 millions le nombre de personnes vivant avec le VIH/SIDA dans le monde avec 2,8 millions de nouvelles infections et environ 1,7 millions de décès liés au VIH/SIDA.

L'Afrique subsaharienne demeure la région du monde la plus touchée avec 23,5 millions de personnes vivant avec le SIDA dont 3,1 millions d'enfants. Toutefois des efforts considérables ont été notés en particulier dans l'accès au traitement dans les pays à revenus faibles et intermédiaires, de l'ordre de 6,6 millions de personnes, soit près de la moitié de ceux éligibles.⁽³⁾

Les premiers cas de la maladie ont été décrits en 1981 aux Etats Unis.⁽¹⁾ De nombreuses recherches ont permis d'isoler en 1983 le VIH-1 comme agent responsable de la pandémie.⁽¹⁰⁾ Un second virus apparenté au premier mais génétiquement distinct, a été décrit pour la première fois en 1985⁽⁸⁾ puis isolé en 1986 à partir de PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) de patients Cap-verdiens et Bissau Guinéens.⁽²⁷⁾ Dénommé VIH de type 2 (VIH-2), ce virus est endémique en Afrique Occidentale, qui en est l'épicentre de ce nouveau virus. Le VIH-2 présente de nombreuses similitudes avec le VIH-1 telles que l'arrangement des gènes de base, les modes de transmission, les voies de réPLICATION intracellulaire et les conséquences cliniques. Toutefois, le VIH-2 est caractérisée par une transmissibilité faible et une évolution vers le SIDA comparée au VIH-1.⁽⁸⁶⁾

Le VIH-1 est divisé en 4 groupes M, N, O et P. Le groupe M, dont la plupart des souches sont impliquées dans la pandémie actuelle, est constitué de 9 sous types : A, B, C, D, F, G, H, J et K.⁽⁹²⁾ Le groupe P de découverte récente, n'a été identifié qu'en 2009, et il n'a montré aucun signe de recombinaison avec les autres groupes de VIH-1.⁽⁹⁴⁾

Au sein du groupe M, il existe des variants résultant des combinaisons inter sous types : ce sont les *Circulating Recombinant Forms* (CRFs), qui sont au nombre de 55¹ ou des formes recombinantes uniques (URFs).^(70, 98) Certains de CRFs recombinants occupent une place importante dans l'épidémie : c'est le cas du recombinant CRF02_AG, qui résulte d'une

¹ <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html> (Consulté le 19.07.13)

recombinaison entre les sous-types A et G ; ce recombinant est le variant prédominant en Afrique de l'Ouest en général et au Sénégal en particulier. ^(80, 117)

La gravité de l'infection à VIH/SIDA est liée au fait que le virus cible principalement et entraîne la destruction des cellules du système immunitaire portant la molécule CD4+ en particulier les lymphocytes TCD4, les monocytes et les macrophages. De ce fait, la mesure du taux de CD4 constitue l'un des marqueurs essentiels du suivi biologique. Mais l'élément essentiel dans la pathogénèse du VIH est le niveau massif de la production virale (dizaines de milliards de particules virales libérées chaque jour chez le sujet infecté non traité) qui est responsable de la destruction des cellules immunitaires. ⁽¹⁰³⁾

C'est dans le but de contrôler cette réPLICATION intensive du virus et de freiner la destruction massive des lymphocytes T CD4 que les sujets ayant un déficit immunitaire important sont mis sous un traitement antirétroviral (TARV) hautement actif associant au moins 3 molécules. Cependant, ce traitement doit faire l'objet d'un suivi afin d'évaluer l'état d'immunodépression du malade mais aussi d'apprécier la réponse au traitement.

Le niveau de la réPLICATION virale est mesuré par la détermination de la charge virale qui est également un marqueur indispensable dans le monitoring du TARV. Les premiers tests commerciaux ont vu le jour en 1996. Depuis, ils ont beaucoup évolués et ont été considérablement améliorés pour tenir compte de la variabilité du VIH-1 ⁽¹²⁴⁾ ; leur seuil de détection est de 10 à 50 copies/ml. ⁽³⁷⁾

Dans les pays à ressources limitées, les obstacles majeurs de la réalisation du suivi des patients sous TARV restent le coût (50 à 100 USD par test), le nombre limité d'infrastructures adéquates, et la logistique (difficultés liées au transport et à la conservation des prélèvements sur tube).

Tous ces obstacles, posant un réel problème pour le suivi virologique des personnes vivant avec le VIH (PVVIH) en zone décentralisée, ont favorisé la promotion de l'utilisation du papier buvard ou DBS (**Dried Blood Spot**) comme support alternatif de prélèvements sanguins.

(60) Le recours au papier buvard pour l'analyse des prélèvements sanguins remonte à 1960 avec le test de Guthrie⁽⁵⁰⁾; il permet le recueil du sang et la conservation sous forme desséché sans détérioration des acides nucléiques. Ainsi les DBS peuvent être aisément réalisés et envoyer au laboratoire après respect des conditions de sécurité et d'hygiène. De nombreuses études ont également rapportées l'usage des DBS comme technique performante pour le suivi virologique (charge virale et génotypage de résistance) des PVVIH en zone décentralisée et recevant un TARV afin de prévenir le développement de la résistance aux ARV.^{(57, 60) (100, 101)}

Au Sénégal comme dans la plupart des pays en Afrique, il existe à ce jour un nombre limité de laboratoires capables de réaliser ce suivi virologique,⁽⁶⁰⁾ tous localisés au niveau de la capitale. Pour tous les patients vivant en dehors de Dakar, la charge virale est réalisée depuis 2008 sur DBS en utilisant la technologie Nuclisens EasyQ HIV-1 Version 2.0 des laboratoires Biomérieux.⁽⁶⁰⁾

La plupart études de charge virale sur DBS ont rapportées la validité de l'utilisation de 2 spots de 50µl de DBS (de 12mm de diamètre) pour la quantification de la charge virale ; et c'est dans ce contexte, que nous nous sommes proposés d'évaluer l'impact du volume de sang déposé sur le papier buvard, sur la valeur de la charge virale mesurée.

Pour atteindre cet objectif, nous avons comparé les résultats de charge virale de 2 spots de 50µl, 75µl, 100µl et 150µl de sang déposés sur papier buvard à un volume de 100µl de plasma.

Ce sont les résultats de cette évaluation qui sont présentés dans ce travail que nous aborderons comme suit :

- Une première partie avec les chapitres :
 - ✓ Généralités sur l'infection à VIH/SIDA, sa physiopathologie et son diagnostic biologique.
 - ✓ Prise en charge des PVVIH au Sénégal.
- Une deuxième partie avec les chapitres :
 - ✓ Contexte, Justificatif et Objectifs de l'étude.
 - ✓ Matériel et Méthodes.
- Une troisième partie où les résultats obtenus seront analysés, commentés et discutés avec la revue de la littérature.
- Une conclusion avec des recommandations et des perspectives qui en découlent.

PREMIERE PARTIE :

GENERALITES SUR

L'INFECTION A

VIH/SIDA

Chapitre I : L'infection à VIH/SIDA

1. HISTORIQUE DE L'INFECTION A VIH/SIDA

En 1981, des chercheurs du CDC (Center for Disease Control ; USA) d'Atlanta dans le *Mortality and Morbidity Weekly Report*, décrivaient l'apparition chez des jeunes homosexuels masculins d'une infection rare, présentant un tableau clinique inhabituel. A cette même époque, les pneumonies à *Pneumocystis jiroveci* anciennement *carinii*⁽¹⁾ puis les sarcomes de Kaposi observés chez les malades⁽²⁾ étaient corrélés à un déficit immunitaire profond ; déjà reconnu comme étant lié à une disparition d'une population des cellules de l'immunité : les lymphocytes T CD4. Ces observations orientèrent la recherche de l'agent responsable vers celle d'un virus dont le refuge serait les cellules immunes des organes lymphoïdes.

Le Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise (SIDA) a été rapidement considéré comme une maladie virale transmissible par voie sexuelle, par voie sanguine et plus tard par le lait maternel.^(9, 65, 115)

C'est ainsi qu'en 1983, l'équipe du Professeur MONTAGNIER^(10, 24) de l'institut Pasteur de Paris isola pour la première fois des cellules lymphoïdes ganglionnaires d'un patient atteint de lymphoadénopathie généralisée persistante, un rétrovirus humain encore inconnu à l'époque. Ce virus fut dénommé quelques années plus tard, Virus de l'Immunodéficience Humaine.

Dès 1985, la notion de variabilité génétique du VIH a été évoquée par la découverte chez les patientes travailleuses du sexe, originaires d'Afrique de l'Ouest, d'un second virus apparenté au premier mais génétiquement distinct.^(8, 28) Ces virus de la même famille, considérés comme agents responsables du SIDA, furent dénommés après une harmonisation taxonomique, VIH-1 et VIH-2.

En 1985, l'utilisation de peptides liés au même support en polystyrène comme dans la synthèse des peptides a permis la mise en place d'un système de test hautement spécifique et sensible, sans risque de réaction croisée non spécifique en raison d'une contamination par des matières de protéine bactérienne ou cellulaire.⁽⁷⁸⁾ Depuis le début des années 90, différentes techniques ont permis de réaliser des tests de dépistage à résultat rapide. Au milieu des années 2000, des tests rapides, utilisant les techniques d'immunofiltration ou d'immuno-

chromatographie à la recherche d'anticorps anti-VIH ont vu le jour et permettent d'obtenir un résultat dans un délai inférieur à 30 minutes grâce à un kit de réactifs sans avoir besoin d'avoir recours aux équipements sophistiqués d'un laboratoire. Ils peuvent être réalisés sur différents fluides biologiques dont le sérum, le sang total ou la salive.

En 1996, les premiers tests commerciaux pour la détermination de la charge virale de l'infection à VIH-1 ont été disponibles⁽⁷²⁾ ainsi que les premières trithérapies. Les résultats après leur mise en place ont été encourageants.

2. BIOLOGIE ET TAXONOMIE DU VIH-1

2.1. Définition et classification du VIH-1

Le VIH-1 est un *Lentivirus* appartenant à la famille des *Retroviridae* et à la sous-famille des *Lentivirinae*.

Les *Retroviridae* (ou Rétrovirus) constituent une famille de virus à ARN caractérisés par la présence d'une enzyme structurale, la transcriptase inverse ou reverse transcriptase (RT) capable de synthétiser, à partir de l'ARN viral, un ADN bicaténaire qui va s'intégrer dans le génome de la cellule hôte.

Les Rétrovirus étaient subdivisés en 7 genres regroupés dans 3 sous-familles selon l'ancienne classification. La nouvelle classification basée sur leur pathogénicité et leur morphologie ne considère plus que 2 familles : celle des *Orthovirinae* regroupant les 6 premiers genres y compris les Lentivirus et celle des *Spumavirinae*.⁽¹⁶⁾

Les Rétrovirus sont capables d'infecter toutes les espèces animales, notamment les vertébrés parmi lesquels : les bovins, les caprins, les équidés, les chats et les primates. Le VIH-1 est classé dans le « sous-genre » des *Lentivirus* des Primates à l'instar des virus de l'immunodéficience simienne ou SIV (Simian Immunodeficiency Virus).

2.2. Morphologie et structure du VIH-1

Le VIH-1 se présente schématiquement en microscopie électronique sous forme de particule sphérique de 90 à 120 nm de diamètre comme le montre la figure 1.

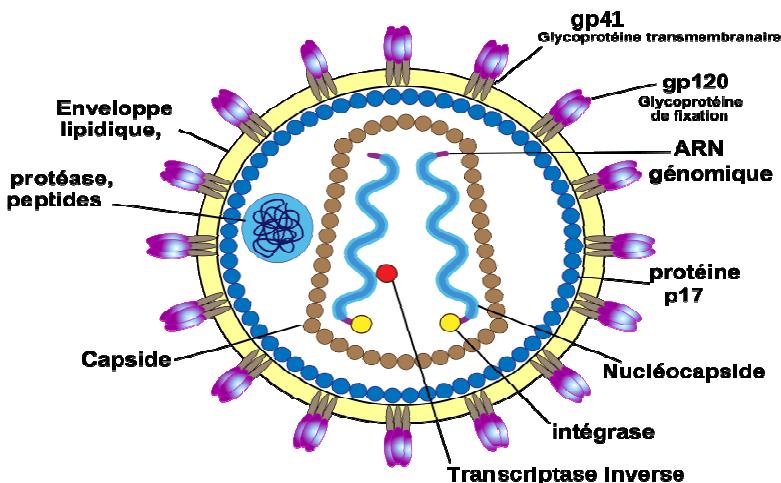


Figure 1 : Structure du VIH http://commons.wikimedia.org/wiki/File:HIV_Virion-fr.svg

La particule virale comprend de l'extérieur vers l'intérieur :

- **Une enveloppe** constituée d'une bicouche lipidique qui provient de la membrane plasmique de la cellule hôte, acquise par le virus lors de sa sortie par bourgeonnement. Cette membrane porte 2 types de glycoprotéines, la gp 120 et la gp 41. La glycoprotéine 120 (gp120) est une partie importante des pointes de l'enveloppe qui ornent la surface du VIH-1 et une des principales cibles des anticorps neutralisants. Cette glycoprotéine de surface (**gp120**) est attachée de façon non covalente à la glycoprotéine transmembranaire **gp41**. Les protéines d'enveloppe gp120 et gp41 jouent un rôle crucial de récepteur dans la liaison et la fusion membranaire du virus avec lymphocytes CD4 +. Le fragment 254-274 de la gp120 est conservé dans toutes les souches de VIH, et faisant partie de la protéine gp120, il se comporte d'une part comme un « immuno silencieux » et d'autre part comme un « immuno réactif ». Lorsque ce fragment se lie à son récepteur, il active le domaine de fusion de la gp41 qui permet la pénétration du virus dans les cellules CD4 + des cellules-hôtes. ⁽⁶¹⁾
- **Une matrice** constituée par la protéine **p17**, est retrouvée sous la bicouche lipidique. La protéine **17 MA** est liée à la surface interne de l'enveloppe par l'intermédiaire d'un acide myristique et stabilise la structure. La protéine p17 du VIH-1 est une principale protéine de structure impliquée dans les différentes étapes du cycle de vie du rétrovirus. Elle participe aux premières étapes de la réPLICATION du virus et dans l'enveloppement des virions néoformés et l'assemblage des particules. Outre ses fonctions bien établies, la p17 agit comme une cytokine virale qui

fonctionne sous forme pro active. Les cellules T humaines favorisent la production et la libération des cytokines pro-inflammatoires et la réPLICATION du VIH-1 après liaison à un récepteur cellulaire (p17R). Ainsi, la p17 pourrait jouer un rôle clé dans le réseau complexe de facteurs de stimulation hôte et dérivés de virus qui contribuent à créer un environnement favorable pour l'infection et la réPLICATION.⁽⁴⁰⁾

La p17 a une capacité d'induire une activation et une inflammation des monocytes ; il a été démontré que le CXCR1 est un récepteur moléculaire responsable de l'activité des chimiokines de la p17 sur les monocytes.⁽⁴⁴⁾

La protéine p17 agit en aval de la protéine kinase C et inhibe la kinase du facteur neurotrophique B-brain-derived de la voie du récepteur tyrosine (TrkB-BDNF). Il empêche les facteurs de survie et augmente l'expression de la protéine précurseur de l'amyloïde suggérant ainsi son implication dans les voies Abeta pro-apoptotiques présentes dans la maladie d'Alzheimer.⁽⁸³⁾

- **Une capsidE** située au centre du virus, de structure conique protège l'ARN viral et est constituée de la protéine **p24**. Elle possède 2 régions fonctionnelles essentielles : la région majeure d'homologie (MHR) et la région N-terminale (Amino-terminale). La région majeure d'homologie en position centrale de la protéine, intervient avec la région Carboxy-terminale (C-terminale), dans la formation des oligomères **p24 CA** conduisant à l'assemblage de la particule virale. La région N-terminale intervient dans la morphogénèse de la capsidE.⁽¹⁰⁵⁾
- **Une nucléocapsidE** constituée principalement par une protéine basique **p7**. La **p7** possède 2 motifs en doigts de zinc, le premier permettant l'emballage de l'ARN par interaction avec les acides nucléiques ; le second est requis pour la stabilité des particules virales.

Le rôle de la nucléocapsidE (NC) dans les étapes précoceS de la réPLICATION rétrovirale semble être celui d'un facilitateur pour l'intégration et la transcription inverse. L'un des principaux rôles du NC est d'améliorer l'efficacité de l'infection précoce, augmentant ainsi la probabilité de réPLICATION productive et, finalement, de la survie des rétrovirus.⁽¹¹⁶⁾

NCp7 est une protéine qui a un rôle de chaperonne mais aussi un important rôle dans la dimérisation de l'ARN et son encapsidation. La présence et le type du doigt Zn est important pour l'activité chaperon du NCp7 mais pas l'ordre des doigts Zn.

La protéine p6 : elle joue un rôle dans l'incorporation de VPR (Viral Protein R) lors de l'assemblage de particules virales indique que p6 module les interactions membranaires du gène *gag* du VIH-1. Il régule l'étape finale de la libération des virions naissants de la membrane cellulaire une action tardive. Il a été montré que la p6 module les interactions membranaires du gène *gag* du VIH-1.⁽¹⁰⁹⁾

- **Un génome viral** représenté par 2 brins d'ARN monocaténaires de polarité positive.
- **Des enzymes virales** à savoir, **la reverse transcriptase (RT), l'intégrase (IN) et la Protéase (PR).**

Outre les protéines virales, on retrouve aussi dans la particule virale des molécules d'origine cellulaire.

2.3. Organisation génomique du VIH-1

Le génome du VIH-1 est caractérisé par une grande variabilité et un polymorphisme d'une souche à une autre ; cependant la structure génétique est toujours similaire et, de l'extrémité 5' – P vers l'extrémité 3'- OH, on retrouve l'organisation suivante : LTR-gag-pol-vif-vpr-vpu-env-tat-rev-nef- LTR.

Les LTR (Long Terminal Repeat) sont des séquences non codantes contenant de nombreux sites potentiels de liaisons avec des protéines cellulaires.

Neuf cadres de lectures ouverts (ORFs, Open reading frames) sont présents, chacun correspondant à un gène. Certains de ces gènes codent pour plusieurs protéines via un précurseur : ce sont les gènes de structure *gag*, *pol* et *env*. D'autres gènes sont présents sur le génome : ce sont les gènes régulateurs (tat et rev) et les gènes accessoires (*vif*-*vpr*-*vpu* et *nef*). Deux protéines sont codées en exons : Tat et Rev (protéines régulatrices).

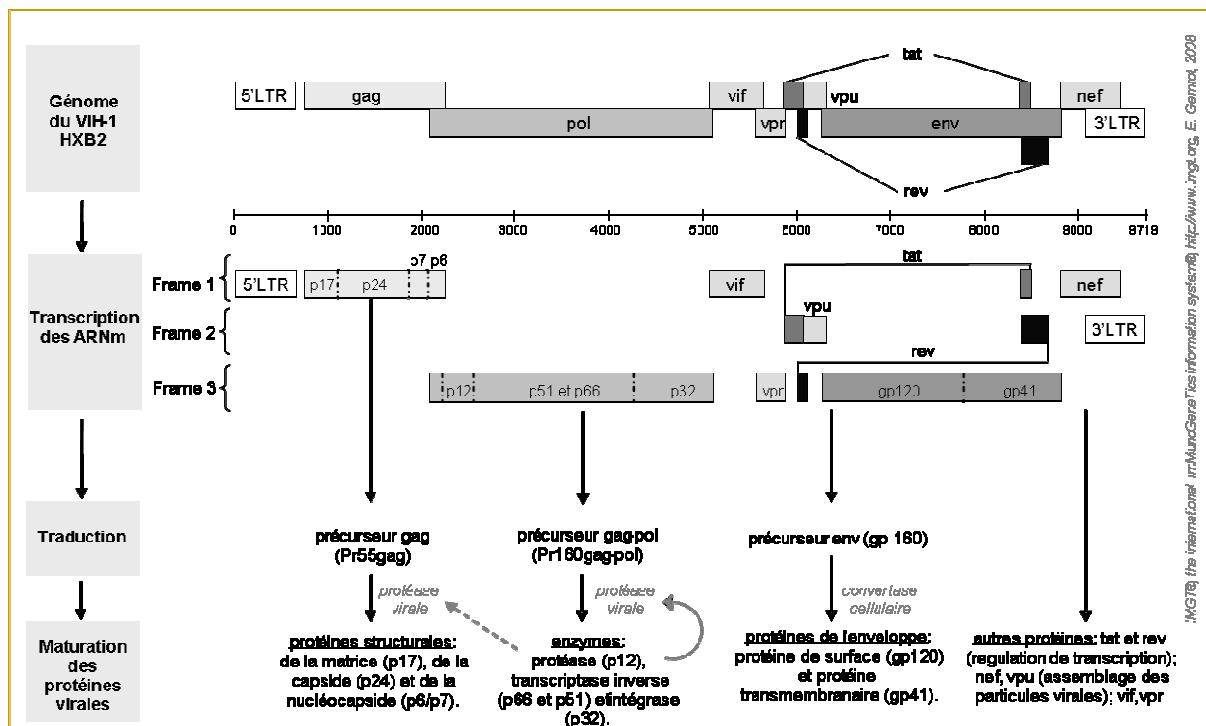


Figure 2 : Schéma du génome VIH-1⁽⁸⁴⁾

2.3.1. Les gènes de structure

Le gène **gag** (gènes des antigènes de groupe) : c'est le premier cadre de lecture ouvert sur le génome VIH. Il a une longueur d'environ 1500 Pb (paires de bases) et code pour la poly protéine Pr 55gag qui, après clivage par la protéase, donne de l'extrémité N-terminale vers C-terminale, les protéines structurales du virion mature : p17MA, p24CA, p7NC, p6 et 2 petits peptides p1gag et p2gag. Une mutation introduite dans le gène **gag** (dans la partie codant pour la protéine p24) entraîne l'incapacité du virus muté à se répliquer.

Le domaine MA (matrice) de la poly protéine gag joue plusieurs rôles importants au cours de l'assemblage du virus. La poly protéine gag est connue pour cibler le feuillet interne de la membrane plasmique pour le bourgeonnement du virus, mais des études récentes ont révélé que MA contribue également à l'emballage sélective de l'ARN génomique (ARNg) dans les virions.⁽⁹⁰⁾

Le ciblage et la reliure de Gag à la membrane plasmique sont les premières étapes de ce processus d'assemblage et sont médiés par le domaine de la matrice de Gag.⁽²⁶⁾

Le gène **pol** (pour polymerase) : c'est le gène le plus conservé du génome, avec une longueur d'environ 3000 Pb, codé sous forme de poly protéine Pr160gagpol. A son extrémité

existe un petit gène qui code pour une protéase dont le rôle est de cliver les protéines produites par le gène ***gag***. Le gène ***pol*** code pour les 3 enzymes virales :

- **La transcriptase inverse TI** : c'est une ADN polymérase ADN/ARN dépendante qui est l'une des enzymes les plus importantes. Elle est responsable de la transformation de l'ARN simple brin en ADN proviral simple brin, puis de la formation de l'ADN complémentaire qui va donner naissance à un ADN double brin capable de s'intégrer dans le génome cellulaire. Elle est aussi responsable de la grande diversité du VIH, du fait de la survenue de nombreuses erreurs pendant les cycles de réPLICATION et de l'absence de fonction de correction.
- **La protéase virale PR** joue un rôle important dans la maturation de la particule virale. Il est obtenu après clivage de la polyprotéine Pol. Les polyprotéines Gag et Gag-Pol qui sont incorporées dans les virions immatures doivent être clivées par la PR pour produire des virions matures qui sont infectieux. Cette maturation se produit pendant ou peu après les bourgeons du virus de la cellule hôte. PR clive au niveau de plusieurs sites au sein de la polyprotéine Gag-Pol pour produire les sous-unités MA, CA, NC, et les protéines P6.
- **L'intégrase IN** va permettre l'intégration dans le génome de la cellule infectée de l'ADN néo synthétisé par la TI. Pour cela, l'enzyme coupe le génome cellulaire pour y intégrer le provirus par les séquences LTR qui constituent les points d'ancrage.

Le gène ***env*** (pour enveloppe) : c'est le gène le plus variable avec une longueur d'environ 2500pb. Il permet la synthèse des glycoprotéines de l'enveloppe virale à partir d'un précurseur intracellulaire. Il est caractérisé par un polymorphisme important qui permet au virus d'échapper au système immunitaire.

Les glycoprotéines Env sont synthétisées sous forme d'une poly protéine (gp160) qui est clivée par des protéases cellulaires vont donner à maturité la glycoprotéine de surface gp120 et la glycoprotéine transmembranaire gp41. Lors de l'assemblage du virus, le complexe gp120/gp41 est incorporé sous forme de pointes hétérotrimériques dans la bicouche lipidique des virions naissants. ⁽²³⁾

Le VIH-1 est entièrement dépendante de la protéine Env pour pénétrer dans les cellules. Le précurseur Env (ou gp160) génère les 2 glycoprotéines qui forment l'enveloppe virale⁽²⁵⁾ :

- **La glycoprotéine de surface Gp120**, est composée de 5 domaines (C1-C5) très bien conservés d'une souche à l'autre et, de 5 domaines hypervariables (V1-V5) qui forment

à leur base des boucles. La boucle V3 apparait dans le choix du tropisme viral et elle détermine l'efficience avec laquelle, le CD4 soluble peut bloquer l'infectivité de la souche virale.

- **La glycoprotéine transmembranaire Gp41**, contient un domaine N-terminal promoteur de la fusion membranaire entre le virus et la cellule hôte. Elle est liée aux régions hydrophobes des extrémités N-terminal de la **gp120**.

2.3.2. Les gènes de régulation et les gènes accessoires

Les gènes *vif*, *vpr*, *vpu*, *nef* sont des gènes accessoires alors que *rev* et *tat* codent pour les protéines virales régulatrices donc tous les rôles ne sont pas encore tout à fait élucidés ; mais leur implication dans le cycle réplicatif du virus a été décrite. Ces protéines semblent également participer à l'infectiosité du virus et à sa pathogénicité en modifiant l'expression des gènes cellulaires.

➤ **Le gène tat** (trans-activator of transcription), formé de deux exons, il code pour les protéines p16Tat et p14Tat, toutes deux fonctionnelles. La p14, synthétisée la première, se lie à l'élément TAR du LTR pour activer la transcription des ARNm viraux. Tat, petite protéine de base (86-102 résidus), améliore considérablement l'efficacité de la transcription virale.

Tat est une protéine de transactivation robuste dont l'activité de transactivation n'est pas limitée à des gènes du VIH-1 seul. En plus de la modulation des gènes du VIH-1, Tat semble réguler positivement un certain nombre de gènes viraux non-VIH, résultant en une activation du virus. En plus des missions de régulation de Tat dans la transactivation des gènes des virus, elle a été impliquée comme un modulateur de niveau d'expression d'un certain nombre de gènes cellulaires.⁽¹¹¹⁾

➤ **Le gène rev** (regulator of expression virus) est le second facteur de régulation nécessaire à l'expression du virus. Il code pour la phosphoprotéine pp20Rev qui s'accumule dans le nucléole de la cellule hôte et qui intervient dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes de structure assurant le transport des transcrits primaires ou mono-épissées du noyau vers le cytoplasme.

La protéine Rev a été longtemps reconnue comme essentiel pour la phase tardive du cycle de réplication du virus, en raison de sa forte augmentation de l'expression des protéines structurales. Tout de même, un certain nombre d'études récentes ont démontré

que Rev peut également interférer avec l'intégration de l'ADNc par transcription inverse dans le génome de la cellule hôte.⁽⁴⁹⁾

- **Le gène vif** (viron infectivity factor) est une petite phosphoprotéine de base de 23kD, qui est essentielle à la réplication virale et à la pathogénèse. La fonction la mieux caractérisée de Vif est sa capacité à neutraliser le facteur antiviral de la cellule hôte qui est l'APOBEC3G, ce qui rend les particules virales plus infectieuses. En outre, Vif peut réguler la transcription inverse et la phase avancée de la réplication de la particule virale et provoquer la cessation du cycle cellulaire en phase G2.⁽⁷¹⁾
- **Le gène vpr** (viral protein R) code pour une protéine de 14kD incorporée dans le virion et qui est localisé dans le noyau. Cette protéine contribue à la pathogénèse du VIH-1 à travers la transactivation des LTR, le transport du complexe de pré intégration dans le noyau, l'arrêt de la croissance cellulaire en phase G2 et l'induction de l'apoptose.⁽⁶⁶⁾
- **Le gène vpu** (viral protein U) est retrouvé dans le génome du VIH-1 et du SIV_{CPZ} et non chez le VIH-2. Elle est la plus petite des protéines codées par le VIH-1. Cette protéine transmembranaire interagit avec la molécule CD4 au niveau du réticulum endoplasmique rugueux (RER), entraînant sa dégradation par la voie du protéasome. Vpu joue un rôle de facilitateur pour la libération des virions à partir des cellules infectées. Cependant, la libération du virus est spécifique de certaines cellules, ce qui suggère que certaines cellules peuvent exprimer un facteur de restriction qui empêche la libération du virus en l'absence de *vpu*. La BST-2 (Bone Marrow Stromal antigen 2) ou tetherin a été identifiée comme étant ce facteur.⁽¹⁰⁴⁾
- **Le gène nef** (negative expression factor) code pour une protéine de 27kD myristillée et qui est une des premières synthétisées dans les cellules infectées. Il est l'un des gènes accessoires les plus importants. Le gène nef est nécessaire pour une forte réplication virale et par conséquent, contribue indirectement à la destruction des cellules T CD4+.

2.3.3. Les LTR

Le génome du VIH-1, comme tout rétrovirus, présente à chacune de ses extrémités une séquence appelée *Long Terminal Repeat* (LTR) ou longue répétition terminale. Les LTR, qui sont des régions non codantes, contiennent les éléments promoteurs qui contrôlent l'intensité de l'expression des gènes du virus et l'intégration aux gènes de la cellule hôte. Des séquences cibles sont présentes au sein des LTR :

- La séquence TAR est activée par le gène *tat* ;
- La séquence NF κ B, capable d'initialiser la rétrotranscription, est activée par les lymphokines (TNF) ou par des facteurs viraux (virus de l'hépatite B par exemple).

Le réticulum endoplasmique est le principal chaperon des LTR.⁽⁷³⁾

2.4. La variabilité génétique du VIH-1

La variabilité génétique du VIH-1 fut reconnue très tôt après sa découverte. Les virus isolés chez différents patients n'étaient pas génétiquement identiques et au sein d'un même patient, de multiples formes virales étaient identifiées. Dès 1986, on connaissait l'existence de deux types de virus, le VIH-1 le plus répandu dans le monde et le VIH-2 à localisation restreinte et essentiellement retrouvé en Afrique de l'Ouest.

Bien que le VIH-1 et le VIH-2 appartiennent au même sous-groupe des *Lentivirus*, ils ne présentent que 40 à 50% d'homologie génomique,⁽⁵¹⁾ et chaque type de virus est lui-même représenté par des virus génétiquement éloignés⁽⁴¹⁾. Ainsi le VIH-1 est divisé en 4 groupes de virus : les VIH-1 du groupe M (majoritaire), qui correspondent aux virus les plus répandus dans le monde, les VIH-1 du groupe N (non M et non O)⁽¹⁰⁸⁾ et du groupe O (Outlier)⁽²²⁾ qui ont été identifiés respectivement au Cameroun et dans les régions de l'Afrique Centrale, les VIH-1 du groupe P découvert récemment en 2009.⁽⁹⁴⁾

Les VIH du groupe M sont eux-mêmes représentés par différents sous-types (A, B, C, D, F, G, H, J et K) et sous sous-types (A1, A2, A3, A4, A5, F1, F2...) ; le sous-type C est le plus répandu dans le monde. L'infection simultanée d'un individu par deux sous-types différents de VIH-1 est possible et peut être responsable des événements de recombinaisons virales et engendrer des CRFs. De nos jours, 55 CRFs² ont été décrits dont le CRF02_AG est la plus répandue des CRFs dans le monde.⁽⁵⁵⁾ Par ailleurs, on note les URFs pour Unique Recombinant Forms qui sont des formes recombinantes retrouvées de façon sporadique chez des individus isolés.^(70, 98)

² <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html> (Consulté le 19.07.13)

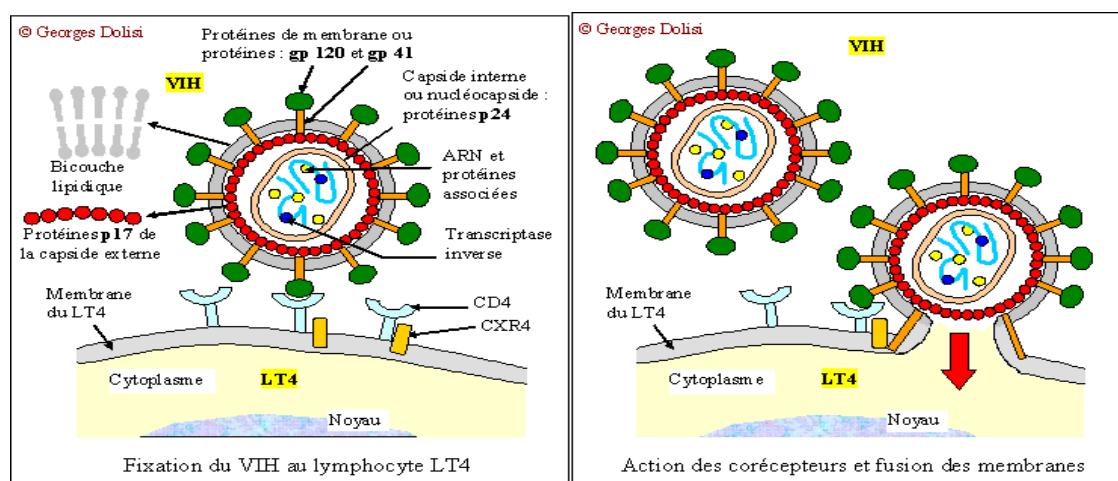
2.5. Le cycle répliquatif du VIH-1

Le cycle de réPLICATION du VIH-1 est un processus séquentiel soumis à la régulation par des protéines virales et cellulaires.

Le VIH est un rétrovirus qui a besoin d'intégrer le noyau de la cellule infectée pour détourner le fonctionnement cellulaire afin d'assurer sa réPLICATION.

L'infection virale peut être déCOMPOSÉE en plusieurs étapes correspondant chacune à un maillon essentiel du cycle de réPLICATION du virus et aboutissant à la formation de nouveaux virions.⁽⁹⁹⁾

- **L'attachement** (**Figure 3**) du virus à la cellule hôte se fait par une interaction spécifique entre la gp120 et son récepteur, la molécule CD4. Cette fixation induit des changements conformationnels permettant la reconnaissance de la gp120 par les co-récepteurs. Il y'a alors fusion entre la membrane virale et la membrane cytoplasmique cellulaire



3a

3b

Figure 3 : Schéma de la fixation (3a) et de l'entrée du VIH (3b)

http://georges.dolisi.free.fr/Physiopathologie/sida_infection.htm

- **La décapsidation et la transcription inverse** (**Figure 4**) : au cours de cet événement, le virus est partiellement et progressivement désassemblé dans le cytoplasme. C'est à partir des complexes obtenus qu'à lieu dans le cytoplasme la transcription inverse du génome viral. Grâce à un ARNt lysine comme amorce, la RT synthétise un brin d'ADN complémentaire de l'ARN viral et génère à chaque extrémité de longues répétitions terminales identiques (Long Terminal Repeat). La RNase H dégrade le brin d'ARN pendant qu'un deuxième brin d'ADN est constitué. Le génome viral

s'associe avec des protéines virales et cellulaires en un complexe nucléoprotéique, le complexe de pré-intégration.

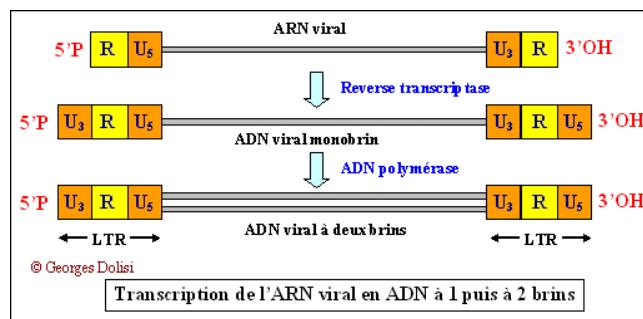


Figure 4 : Schéma de la transcription inverse

http://georges.dolisi.free.fr/Physiopathologie/sida_infection.htm

- **L'import nucléaire et l'intégration (Figure 5) :** après la transcription inverse, le génome viral est acheminé dans le noyau de la cellule sous forme de complexe de pré-intégration au noyau. L'ADN viral est intégré dans l'ADN chromosomique de la cellule infectée par l'action de l'intégrase virale. Le virus est alors sous sa forme de provirus.

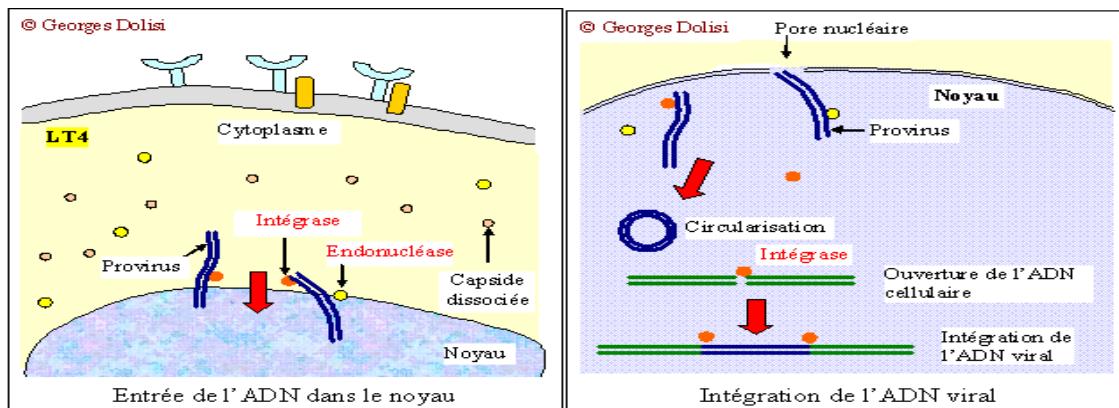
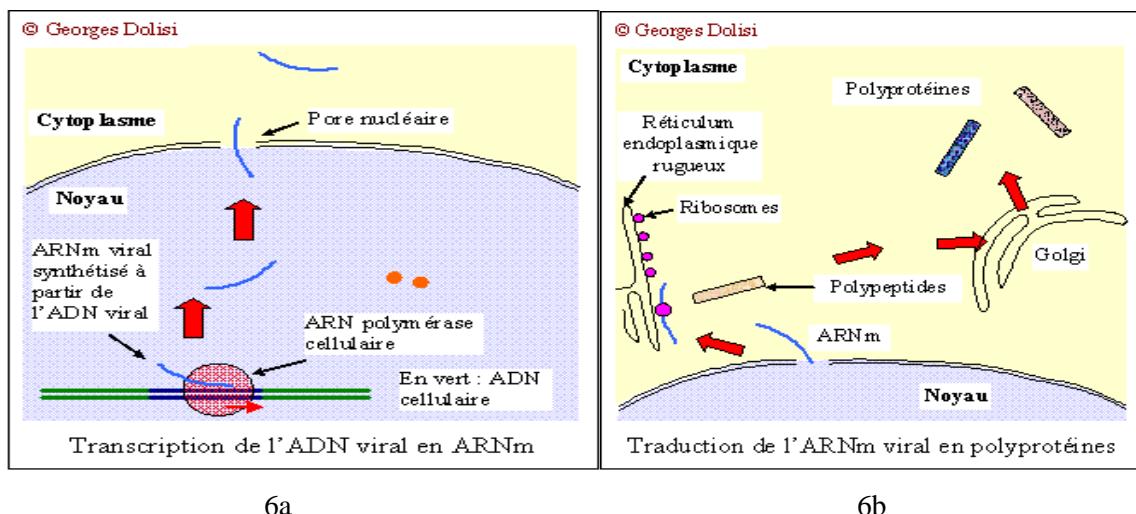


Figure 5 : Schéma de l'intégration

http://georges.dolisi.free.fr/Physiopathologie/sida_infection.htm

- **Transcription et traduction (Figure 6) :** à partir du promoteur viral situé en 5' du LTR, les copies intégrées d'ADN du VIH-1 servent de matrice pour la synthèse d'ARN messagers viraux grâce à l'ARN polymérase II et les interactions coordonnées de la protéine Tat et des facteurs de transcription.



6a

6b

Figure 6 : Schéma de la transcription (6a) et de la traduction (6b) du génome viral

http://georges.dolisi.free.fr/Physiopathologie/sida_infection.htm

➤ L'assemblage et le bourgeonnement (Figure 7) : les poly-protéines Pr55Gag et Pr160Gag-Pol, en association avec les protéines accessoires (Vif, Vpr et Nef) et le génome viral nouvellement synthétisé, se regroupent à la membrane puis s'assemblent avec les protéines de l'enveloppe, la gp120 et la gp41. C'est le Vpu qui stimule la relâche des nouvelles particules virales. La protéase virale clive les précurseurs protéiques Pr55Gag et Pr160Gag-Pol et la capside se condense puis adopte sa forme caractéristique en cône. Le virus peut alors entamer un nouveau cycle de réPLICATION.

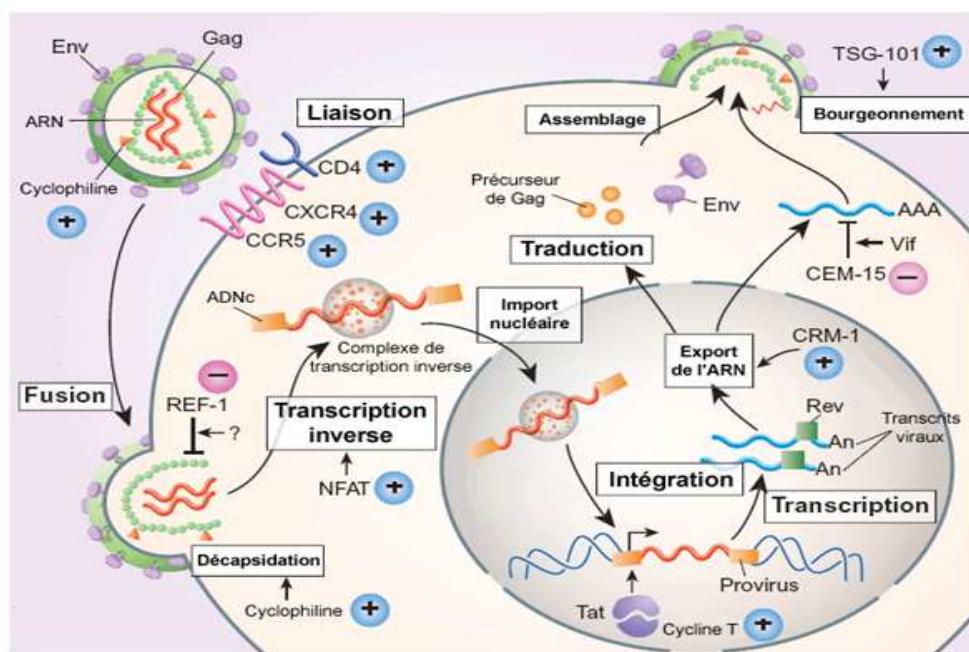


Figure 7 : Assemblage et bourgeonnement des nouveaux virions ⁽¹¹³⁾

2.6. Le tropisme du VIH-1

Les cellules sensibles à l'infection VIH sont principalement celles qui expriment à leur surface le récepteur CD4+ et l'un des co-récepteurs, CCR5 et/ou CXCR4.⁽⁸⁹⁾ Toute modification dans les préférences des corécepteurs ainsi que l'efficacité et le mécanisme d'interaction entre le VIH-1 et le CCR5 et/ou le CXCR4 a une influence significative sur le tropisme viral, la progression de la maladie et la réponse aux antagonistes du corécepteur.⁽⁴⁶⁾

La découverte du VIH-1 fut rapidement suivie par la caractérisation de son principal récepteur cellulaire, le CD4. Chacun des monomères de gp120 contient un site de liaison pour le CD4. Cette molécule s'exprime fortement sur les thymocytes et les lymphocytes TCD4+ matures, et plus faiblement sur les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules neuronales et les cellules gliales. Par ailleurs, le CD4 agit aussi comme ligand pour le Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II (CMH II). Le CCR5 et le CXCR4, deux co-récepteurs de chimiokines, sont apparus, au milieu des années 90, comme des éléments clés du processus d'entrée virale. Il s'est avéré que ces co-récepteurs coopèrent avec le CD4 lors du processus de fusion. Bien que d'autres récepteurs de chimiokines ont été également décrits (le CCR2b, le CCR3, le CCR8, le CXCR3, le CXCL16) le CXCR4 et le CCR5 sont les plus utilisés. L'emploi préférentiel de l'un ou de l'autre des co-récepteurs détermine le tropisme des souches virales (X4, R5, X4R5). Les souches R5 infectent uniquement des cellules exprimant le CCR5 à leur surface (macrophages, cellules dendritiques, cellules TCD4+ activées). Par contre les souches X4 ciblent et infectent exclusivement les cellules exprimant le CXCR4 (cellules T CD4+ naïves).

3. Physiopathologie de l'infection à l'infection à VIH-1

L'infection par le VIH-1 induit un déficit progressif conduisant à l'apparition d'infections opportunistes, et de néoplasies caractérisant le SIDA clinique. Le VIH a pour cibles les cellules du système immunitaire principalement celles exprimant le marqueur CD4+ c'est-à-dire les lymphocytes T CD4+, le monocyte-macrophage et les cellules dendritiques. La conséquence est une diminution importante du nombre et de la fonctionnalité de ces éléments protecteurs qui deviennent ainsi incapables de contrôler les agents microbiens. De plus, chez les sujets infectés, les lymphocytes T CD8+ non atteints entrent en apoptose.⁽⁴⁷⁾

L'infection à VIH-SIDA évolue en trois phases : la primo-infection, la phase de latence clinique et la phase d'immunodépression symptomatique aboutissant au SIDA. Chacune de ces phases est associée à une modification particulière du taux de CD4+.

3.1. La phase de primo-infection

La primo-infection correspond à la période située entre la transmission du virus et l'apparition d'une réponse immunitaire spécifique contre le virus. La primo-infection correspond à un ensemble de manifestations cliniques et biologiques s'apparentant à la mononucléose (fièvre, rougeur cutanée, fatigue, pharyngite, myalgie) accompagnés d'une virémie importante. Cette période est aussi caractérisée par une chute marquée du compte de cellules T CD4+ dans le sang périphérique et de la formation d'un réservoir de cellules T CD4+ infectées de façon latente par le VIH-1.

Le moment entre l'infection virale initiale et l'atteinte du niveau viral de base constitue la phase aiguë de la maladie.⁽⁵⁸⁾ Bien que certains individus soient asymptomatiques durant cette période, 50-90% des individus infectés développent des symptômes non spécifiques ressemblant à la grippe. La primo-infection se caractérise par une réPLICATION très active du virus, notamment dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques) donnant naissance à une virémie considérable. Mais celle-ci est vite contrôlée par une intense réactivité lymphocytaire T cytotoxique clonale, qui peut cependant, induire des effets immunopathologiques contribuant au déficit immunitaire car dirigé contre d'autres cellules immunitaires exprimant les antigènes viraux.⁽⁹¹⁾

3.2. La phase de latence clinique

Il ne s'agit pas d'une phase de latence virologique même si les taux de CD4 et de charge virale paraissent relativement constants. Le sujet infecté entre dans une période asymptomatique définie comme la période de latence clinique (aussi appelée chronique) qui persiste pendant plusieurs années (approximativement 7-10 ans) avant que ne surgissent les signes cliniques de la maladie. La virémie, qui est très basse au début de la phase chronique, demeure en lente progression tout au long de cette phase en raison d'une réPLICATION virale se poursuivant inexorablement.⁽⁵⁸⁾

Cependant, c'est durant cette phase que le virus va prendre progressivement le dessus sur le système immunitaire. Les cellules folliculaires dendritiques, les lymphocytes et les

macrophages constituent les principaux réservoirs de virus à partir desquels vont pouvoir s'appliquer les stratégies virales de destruction du système de défense de l'organisme à savoir :

- induction progressive d'une réponse CTL inappropriée, déplétion et dysfonctionnement des lymphocytes T CD4+.
- modification des propriétés biologiques du virus.
- variation antigénique conduisant à une diversification virale qui aggrave l'inefficacité de la réponse immunitaire.

3.3. La phase symptomatique aboutissant au SIDA

Ce stade se caractérise par l'apparition d'anomalies plus ou moins graves et non spécifiques, mais qui persistent chez les individus infectés. L'amaigrissement, le gonflement des ganglions, la diarrhée et la fièvre constituent les symptômes fréquemment rencontrés. Par ailleurs, les individus peuvent également développer un zona, une candidose oropharyngée, des crises d'herpès et une leucoplasie chevelue de la langue.⁽⁸⁷⁾

Le SIDA correspond au moment de l'effondrement du système immunitaire (déclin des lymphocytes T CD4+) et de l'augmentation de la virémie. Ce stade, le plus sévère de l'infection, se caractérise par le développement de maladies graves touchant diverses parties du corps. On retrouve notamment la Pneumonie à *Pneumocystis jiroveci* anciennement *carinii*, la tuberculose et la toxoplasmose... or, chez les individus immunodéprimés, le système immunitaire ne peut plus arrêter la multiplication de ces micro-organismes, puisque les cellules T CD4+ « mémoires » qui répondaient spécifiquement à ces antigènes ont été détruites et que le système n'est pas assez fort pour régénérer les cellules lymphocytes T effecteurs.

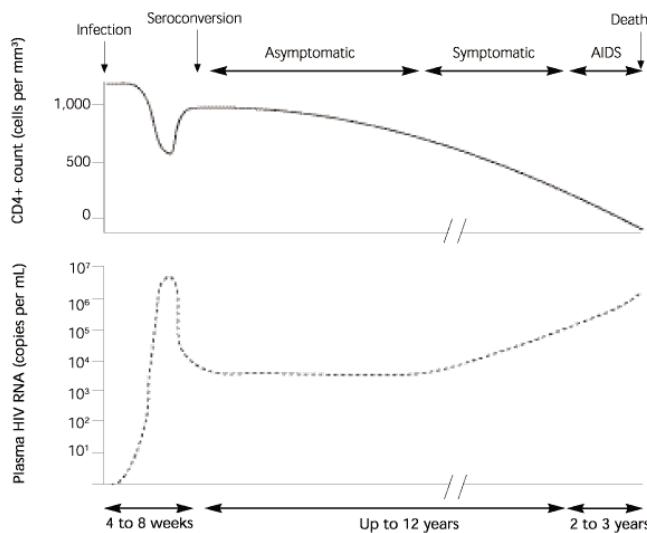


Figure 8 : Evolution des marqueurs biologiques au cours de l'infection.⁽⁸¹⁾

➤ **LES NON-PROGRESSEURS A LONG TERME (32)**

Quelques PVVIH dont le nombre approximatif se situant entre 5 et 7%, ont vécu pendant plus de 10 à 15 ans avec un taux de CD4 normal et sans manifester de symptômes de l'infection par le VIH. Ce sont les non-progresseurs à long terme.

Les sujets Non-Progresseurs à Long Terme (NPLT) sont définis comme des personnes infectées par le VIH, non traités et sans SIDA et avec un taux CD4 élevé et une faible charge virale plasmatique pendant 10 ans ou plus après l'infection. Les HIV Controllers (HIC) sont un sous-ensemble de (NPLT) qui ont en outre une virémie indétectable. ⁽⁷⁴⁾

Il semblerait qu'il existe des différences significatives en faveur des HIV Controllers (HIC) comparées aux patients progresseurs, au niveau de l'expression des CD40L, de la régulation des T (regs) et de CTLA-4. ⁽¹²³⁾

La lente évolution de l'infection à VIH chez les NPLT de race caucasienne, semble être due en partie à l'hétérozygotie du CCR5 allèle Δ32, probablement par diminution de l'expression du co-récepteur CCR5 sur les lymphocytes T CD4. ⁽¹²⁷⁾

4. Modes de transmission

Le VIH a été isolé dans la plupart des liquides biologiques humains : le sang, le plasma, l'urine, le LCR, l'urine, le sperme, les sécrétions vaginales, le lait maternel etc.

Toutefois, la transmission du VIH nécessite une porte d'entrée et le facteur déterminant du risque infectieux est la charge virale du produit biologique contaminant. Différents modes de transmission ont été décrits, le mode vertical et le mode horizontal.

4.1. Transmission horizontale

4.1.1. Par voie sexuelle

La transmission sexuelle à l'infection VIH se fait par l'intermédiaire des muqueuses buccale, génitale ou rectale, lorsqu'elles sont en contact avec les sécrétions sexuelles ou du sang contenant du virus. La muqueuse présente une certaine perméabilité vis-à-vis du VIH. De ce fait, des cellules infectées peuvent être retrouvées sous la muqueuse après une exposition non traumatique de l'épithélium vaginal. La muqueuse rectale, par son épithélium monocellulaire est plus susceptible à l'infection. La membrane rectale est beaucoup plus fine que la membrane vaginale et contient un grand nombre de lymphocytes, de macrophages et d'autres cellules susceptibles à l'infection VIH.

➤ Chez les homosexuels

Chez les homosexuels, plusieurs études ont rapportées que le risque de contamination augmente avec le nombre de partenaires. De plus, des études récents suggèrent que 6% à 8% pourraient être liées à des rapports oro-génitaux.^(36, 59)

En Afrique Subsaharienne, la prévalence globale à l'infection VIH chez les hommes ayant les rapports avec des hommes (HSH) était estimée à 17,9% contre 5% chez les adultes de la population générale.⁽¹¹⁾ En effet, les relations anales peuvent facilement provoquer des micro-plaies de la membrane, ce qui entraîne un contact direct du sperme de l'infecté avec le sang du partenaire.

➤ Chez les hétérosexuels

Les rapports sexuels non-protégés constituent la principale voie de transmission du VIH-1. Le risque de transmission par rapport anal serait environ 10 fois supérieur à celui d'un rapport vaginal, du fait de la finesse et de la structuration de la membrane rectale.⁽⁵³⁾

Selon une étude publiée en 1998, il semblerait que les hommes en période de séroconversion ayant des rapports sexuels par pénétration anale avec leurs partenaires (femmes), seraient plus contagieux que les personnes infectées asymptomatiques, quel que soit le type de contact.⁽⁶⁹⁾

4.1.2. Par voie sanguine

Elle concerne essentiellement trois groupes de populations : les usagers de drogues par voie injectable (IV), les hémophiles et les transfusés. Les professionnels de santé sont également concernés mais beaucoup plus rarement par accidents d'exposition au sang (AES) en milieu de soins et ou de laboratoire. Par ailleurs, il existe d'autres modes de transmission par voie sanguine qui sont moins importantes tels que, les tatouages, scarifications rituelles, excisions, circoncisions et infibulations.

Le dépistage systématique et obligatoire de tous les dons de sang a permis de réduire considérablement le risque de transmission du VIH par transfusion de produits sanguins. L'existence d'un risque résiduel de transmission du VIH n'est pas à écarter et ceci du fait de l'existence d'une fenêtre sérologique. L'amélioration constante de la sensibilité des tests de dépistage aurait permis un raccourcissement de la fenêtre sérologique, expliquant ainsi la diminution progressive du risque résiduel de transmission du VIH par transfusion de produits sanguins.⁽⁹³⁾

La transmission est liée à l'usage commun du matériel d'injections ainsi qu'à l'utilisation des objets nécessaires à la préparation de la drogue qui ont été préalablement contaminés par un autre utilisateur. Les usagers de drogues injectables seraient plus touchés par l'épidémie, avec une séroprévalence de l'infection à VIH au sein de cette population est 22 fois plus élevée que celle au sein de la population générale.⁽³⁾ Selon les résultats de certaines études épidémiologiques, il semblerait que les effets de la consommation de la drogue sur l'infection à VIH-SIDA peuvent être nocifs ou protecteurs ou bien dans certains cas équivoques. ⁽⁶²⁾

L'accident d'exposition au sang (AES) est défini comme étant tout contact percutané (par une piqûre, ou une coupure avec une aiguille, une lame de bistouri ou tout objet vulnérant), ou tout contact cutanéo-muqueux (par projection sur une muqueuse ou sur une surface de peau lésée), avec du sang ou tout liquide biologique contenant du sang et potentiellement contaminant. L'infectiosité (potentiel contaminant) d'un liquide biologique est moindre s'il s'agit d'un patient séropositif asymptomatique plutôt que d'un malade au stade de SIDA. ⁽³⁸⁾ L'infectivité (capacité infectieuse) estimé à la suite d'une exposition par piqûre d'aiguille semble variée de 0,00 à 2,38%. ⁽⁷⁾

La transmission peut se faire dans les 2 sens : sens patient - personnel de santé (risque professionnel) ou dans le sens : soignant – patient. Le risque professionnel étant faible (<0,01%) mais variable selon le stade clinique de la personne source, de la gravité de l'exposition au sang et de la présence ou non de gants. Le « **Syndrome de burn out (épuisement)** », lié aux conditions de travail (manque de temps, de repos, absence de récupérations après les gardes, harcèlement quotidien, stress quotidien, stress de responsabilités, crainte de la contamination etc.) est un facteur favorisant les accidents professionnels. ⁽³⁸⁾

4.2. Transmission verticale

Elle représente environ 90% de l'infection de l'enfant, et les 10% autres sont imputables aux abus sexuels, à la transfusion sanguine et toute autre exposition possible.

Il existe trois possibilités de transmission du virus de la mère à l'enfant :

- Transmission *in utero* du fœtus par passage hémato placentaire ;
- Transmission à l'accouchement
- Transmission via l'allaitement maternel (plus fréquent en Afrique)

Les traitements ARV permettent une prévention quasi complète de la transmission mère-enfant (TME). Le 1^{er} tournant de cette prévention a eu lieu en 1994 lorsqu'il a été démontré qu'un traitement par l'AZT permettrait de réduire de deux tiers le risque de transmission mère-enfant.⁽³¹⁾ Un second tournant a eu lieu en 1996 avec l'avènement des trithérapies.

Cependant, le risque de progression vers le SIDA ou le décès n'est pas augmenté par la survenue d'une, du moins dans les pays industrialisés.⁽¹⁰⁶⁾ Le risque naturel de transmission du VIH-2 à l'enfant est faible (1 à 4%) comparée à celui du VIH-1 (20 à 25%).⁽¹⁷⁾

La transmission mère-enfant a lieu principalement en fin de grossesse (un tiers des cas) et autour de l'accouchement (deux tiers des cas).⁽¹⁰²⁾ La transmission in utero a lieu surtout en fin de grossesse. On sait que la transmission n'a pas lieu au 1^{er} trimestre, hormis peut-être dans des cas de fausse-couche. La transmission au 2^{ème} trimestre, hormis peut-être des cas de fausse-couche. La transmission au 2^{ème} trimestre est possible, mais concerne des circonstances exceptionnelles, notamment l'accouchement prématuré.⁽¹⁵⁾ La transmission peut aussi se faire par voie transplacentaire malgré que le placenta constitue une barrière active contre le passage du virus, qui peut être pris par défaut par ces différents mécanismes.⁽⁷⁷⁾

Des études chez des jumeaux nés de mères séropositives ont montré que le risque de contamination serait plus élevé chez le premier né du fait de la durée du temps de délivrance et donc du contact avec les voies génitales de la mère plus marquée qu'avec le second. Un taux de transmission plus faible lors de l'accouchement par césarienne a été noté.^(45, 64, 107)

Dans des études africaines, le taux de transmissions est doublé chez les enfants allaités au sein.⁽⁸²⁾ Le risque de transmission est important dans les premières semaines, mais il persiste pendant toute la durée de l'allaitement.⁽⁶⁸⁾ Ce risque est augmenté en cas de déficit immunitaire maternel, de charge virale plasmatique maternelle élevée. La charge virale dans le lait maternel joue un rôle important. La transmission par l'allaitement peut être diminuée par un TARV chez la mère et par une prophylaxie étendue chez le bébé.

Actuellement l'OMS recommande l'option B+ qui suggère que « toutes mères séropositives doivent commencer une thérapie antirétrovirale indéfiniment quel que soit le taux de CD4 ».⁽⁵⁾

L'initiation précoce du traitement antirétroviral réduit le taux de transmission sexuelle et les manifestations cliniques du VIH-1.⁽²⁹⁾

5. Epidémiologie

5.1. Aperçu mondial

A l'échelle mondiale, 34 millions [31,4 – 35,9 millions] de personnes vivaient avec le VIH à la fin de l'année 2011, avec seulement 8 millions sous TARV pour 14,8 millions de personnes éligibles au TARV. En 2011, 2,5 millions [2,2 – 2,8 millions] de nouvelles infections VIH et 1,7 millions [1,5 – 1,9 millions] de décès liés au VIH avaient été enregistrés. Cela représente une baisse de 24% de la mortalité liée au SIDA par rapport à 2005 (où 2,3 millions [2,1 – 2,6 millions] de décès avaient été enregistrés). Cette baisse du taux de mortalité lié au VIH s'explique, par l'élargissement et l'intensification des traitements antirétroviraux ainsi que la diminution stable de l'incidence VIH depuis le pic de 1997.⁽³⁾

Selon les estimations, 0,8% des adultes âgés de 15 – 49 ans dans le monde entier vit avec le VIH bien que les circonstances de l'épidémie qui pèsent sur les pays et les régions continuent de varier considérablement. L'Afrique Subsaharienne reste l'une des régions les plus gravement touchées avec près d'un adulte sur 20 (4,9%) vivant avec le VIH, ce qui représente 69% des personnes vivant avec le VIH/SIDA dans le monde. La prévalence régionale de l'infection à VIH est près de 25 fois plus élevée en Afrique subsaharienne qu'en Asie mais environ 5 millions de personnes vivent avec le VIH dans l'ensemble de l'Asie du Sud, du Sud-Est et de l'Est.

Après l'Afrique subsaharienne, les régions les plus fortement touchées sont les Caraïbes, l'Europe de l'Est et l'Asie Centrale où 1% des adultes vivait avec le VIH en 2011.⁽³⁾ Les pays réalisent des progrès historiques dans la lutte contre l'épidémie de SIDA avec en 2011 une réduction de 700 000 nouvelles infections à VIH par rapport à 2001 dans le monde entier.

5.2. En Afrique Subsaharienne

Au cours des dix dernières années, le paysage des épidémies nationales de VIH a radicalement changé, en mieux dans la plupart des pays, en particulier en Afrique Subsaharienne. On note une réduction de 32%, du nombre de personnes décédées de causes liées au SIDA entre 2005 et 2011 (*soit 1,2 millions en 2007*).⁽³⁾

Entre 2001 et 2011, 25 pays à revenus faibles et intermédiaires ont réduit de 50% leur taux de nouvelles infections à VIH. Plus de la moitié de ces pays se situent en Afrique Subsaharienne, une région qui concentre la majorité de nouvelles infections.

Entre 2001 et 2011, le taux de nouvelles infections à VIH a diminué de 73% au Malawi ; de 71% au Botswana, de 68% en Namibie, de 58% en Zambie, de 50% au Zimbabwe. L’Afrique du Sud, le pays le plus durement touché par l’épidémie de VIH, a réduit son taux de nouvelles infections à 41%. Au Swaziland, le pays affichant la prévalence la plus élevée dans le monde, les nouvelles infections ont baissé de 37%. ⁽³⁾

En Afrique centrale et occidentale : le Ghana a enregistré les meilleurs résultats avec une baisse de 66%, suivi du Burkina Faso avec 60% et de Djibouti de 58%. La République Centrafricaine, le Gabon, le Rwanda et le Togo ont atteints des réductions comparables de plus de 50%. Au cours de dix dernières années, l’Ethiopie a atteint une diminution de 90% dans le taux de nouvelles infections. Malgré une baisse de 25% en Afrique Subsaharienne, en 2011, la région représentait 72% de nouvelles infections à VIH dans le monde. ⁽³⁾

5.3. Au Sénégal

Au Sénégal, la prévalence du VIH dans la population générale est estimée à 0,7%, et elle est relativement stable dans la population générale. ⁽⁴⁾ Toutefois, la prévalence reste élevée dans les groupes sensibles : 18,5% chez les professionnelles du sexe, 21,8% chez les MSM (Men have Sex with Men) et 9,2% chez les usagers de drogues injectables.

Il s’agit donc d’un pays à « épidémie concentrée », avec d’une part des prévalences différentes entre la population générale et les groupes sensibles, et d’autre part avec des prévalences variables d’une région à une autre (Dakar 0,6%, Kolda 2,8%, Ziguinchor 3%...) ⁽⁴⁾

L’infection à VIH au Sénégal est caractérisée par la co-circulation des deux types de virus et par une épidémie peu évolutive. La séroprévalence chez les femmes de 15 – 49 ans est supérieure à celle des hommes de la même tranche d’âges: 0,8% contre 0,6% soit un ratio de 1,6 en faveur des femmes. ⁽⁴⁾

Dans l’ensemble, la prévalence augmente avec l’âge passant de 0,1% chez les personnes âgées de 15 – 19 ans à 1,9% chez celles de 45 – 49 ans. Ces variations de prévalence selon l’âge diffèrent selon le sexe avec un taux de 2,4% chez les femmes âgées de 45 – 49 ans (taux plus important par rapport aux hommes de la même tranche d’âge. En somme, il est constaté que les jeunes de 15 – 24 ans restent peu touchés par le VIH avec une prévalence de 0,2% (0,3% chez les hommes et 0,1% chez les femmes). ⁽⁴⁾

6. Diagnostic biologique

En biologie médicale, le diagnostic des infections à VIH chez l'adulte est dans la grande majorité des cas, basé sur la détection des anticorps. Chez les nouveau-nés de mères séropositives, le diagnostic est basé sur des techniques plus complexes pour mettre en évidence la présence du virus.

6.1. Diagnostic indirect

6.1.1. Tests de dépistage

Les tests de dépistage sont basés sur la détection des anticorps anti-VIH (réaction Antigène/Anticorps). Ces tests sont effectués de façon systématique au cours des dons de sang depuis 1985.

Le principe repose sur une réaction immuno-enzymatique de type ELISA (*Enzyme-Linked Immuno-Sorbet Assay*). Il s'agit de la recherche d'anticorps anti-VIH qui utilisait comme antigène, un lysat de virus obtenu par culture cellulaire (tests de 1^{ère} génération) ou des protéines recombinantes obtenues par biotechnologie (tests de 2^{ème} génération). Ces tests ne détectent que les anticorps de classe IgG. Il existe des tests de 3^{ème} génération qui permettent de détecter toutes les classes d'anticorps, en particulier les IgM, et de déceler la séroconversion 5 jours en moyenne avant les tests de 2^{ème} génération. Les tests de 4^{ème} génération combinent à la fois, la détection des anticorps anti VIH et la détection de l'antigène p24.

La sensibilité et la spécificité du test ELISA sont d'environ 99% ; des résultats faussement positifs se produisent chez les femmes multipares, les sujets récemment vaccinés contre la grippe ou l'hépatite B ou en cas de maladie auto-immune. Les anticorps sont détectables 6 mois après l'infection chez 95% des patients ; au cours de l'évolution, lorsque s'installe une immunodéficience marquée, on observe des résultats faussement négatifs.⁽³⁹⁾

6.1.2. Tests de confirmation

En cas de test ELISA positif ou incertain, le résultat doit être confirmé par le « **Western Blot** » qui est la technique de référence, et ayant l'avantage d'être plus spécifique. Il consiste en la recherche des anticorps spécifiques dirigés contre les différentes protéines virales codées par les gènes de structure. Dans la plupart des cas, ce test confirme l'ELISA et met en évidence la réactivité avec toutes les protéines virales. La réactivité isolée à 2 protéines (souvent gp160 et gp24/25, ou gp120/110 et gp41) s'observe en cas de séroconversion (dans les 6 à 12 semaines

après la contamination). La réactivité à une seule protéine (p25 isolée) peut signifier une séroconversion en cours ou une infection au VIH-2. Chez le sujet qui évolue vers le SIDA déclaré, la réactivité anti-p24 décroît. Enfin, l'absence de réactivité au Western Blot permet d'affirmer la séronégativité.

Mais il existe également d'autres tests de confirmation : le LIA (*Line Immune Assay*) à base de peptides synthétiques, le RIBA (Recombinant Immuno Blot Assay) à base de protéines recombinantes et le RIPA (Radio Immuno Precipitation Assay) utilisant un lysat viral radio marqué et ayant l'avantage de différencier les infections mixtes.⁽³⁹⁾

6.2. Diagnostic direct

Dans certaines situations, le sérodiagnostic n'est daucun secours pour apporter la certitude d'une infection par le VIH ; c'est le cas de la primo-infection ou pour le cas d'un nouveau-né de mère séropositive avant la séroconversion. Il existe plusieurs alternatives : Ag p24, l'isolement par culture virale et les techniques d'amplification.

6.2.1. Détection de l'Ag P24

La recherche de l'antigène p24 est une technique de détection précoce de l'infection. L'antigénémie p24, outre le dépistage précoce d'une infection par le VIH (lors de la phase de primo-invasion ou chez le nouveau-né de mère séropositive), pourrait également avoir une valeur pronostique : l'antigène p24 disparaît du sérum après la primo-invasion (présence chez moins de 15% de séropositifs asymptomatiques) et ne réapparaît que lorsque l'infection par le VIH évolue jusqu'au SIDA (présence chez environ 60% des cas de SIDA).^(18, 97)

Le test de détection de l'antigène p24 a été affiné au point que les banques de sang l'utilisent sur tout le territoire des Etats-Unis avec une combinaison de tests d'anticorps anti VIH-1/VIH-2 pour contrôler les dons de sang.⁽³³⁾

6.2.2. Isolement du VIH par culture cellulaire

Cette technique requiert un laboratoire ayant un plateau technique élevé, ceci en raison des risques liés aux manipulations.⁽²⁰⁾

L'isolement du VIH en culture de cellules se fait par co-culture, c'est-à-dire la culture de lymphocytes de la personne qui doit être testée et celle de lymphocytes provenant d'un donneur sain. La co-culture est considérée comme positive, lorsque l'on obtient des hauts niveaux

de transcriptase inverse virale ou de protéine p24 dans le milieu de croissance après au moins deux tests consécutifs.

6.2.3. Détection des acides nucléiques viraux

Elle peut être qualitative ou quantitative et repose sur des techniques d'amplification génique (ADN ou ARN) ou d'amplification du signal.

Il est admis que le niveau de réPLICATION virale est étroitement corrélée à l'aggravation clinique progressive constatée au cours de l'infection par le VIH.⁽⁸⁵⁾ La détermination de la quantité de virus présente dans l'organisme est donc un examen essentiel, en ce sens qu'il permet d'évaluer un traitement antirétroviral en cours chez un patient.

Il existe de nombreuses trousse commerciales permettant la détection/quantification de la charge virale du VIH, parmi lesquelles, on peut citer entre autre :

- ✓ **Cobas Taqman® des laboratoires Roche** qui est une plateforme de PCR en temps réel permettant de détecter/quantifier l'ARN des sous types du VIH-1 du groupe M au niveau du gène *gag* et de la région LTR grâce à l'utilisation d'un standard interne. Les limites de détection vont de 47 à 10 000 000 de copies/ml.
- ✓ **La plateforme m2000rt de Abbott** qui utilise également la PCR en temps réel afin de générer un produit amplifié du génome du VIH-1 dans les échantillons cliniques. Il permet de détecter/quantifier les sous types du groupe M et les isolats du groupe O grâce à des sondes fluorescentes partiellement double brin et cible la région *pol Intégrase* en présence d'un standard interne. Les limites de détection vont de 40 à 10 000 000 de copies/ml.
- ✓ **Quantiplex ou Versant HIV RNA bDNA 3.0® de Siemens** : il s'agit d'une technique semi-automatique d'hybridation de l'acide nucléique et d'amplification du signal utilisée pour quantifier l'ARN du VIH-1 dans le plasma humain. La séquence cible se situe au niveau du gène *Pol* avec des limites de détection allant de 50 à 500 000 copies/ml. L'ARN génomique libéré des virions est capturé sur un support solide (micro puits) par l'intermédiaire des sondes de capture spécifiques constituées d'oligonucléotides de synthèse. Une série de sondes cibles permet de réaliser l'hybridation de l'ARN viral avec différentes séries de sonde réalisant un complexe d'ADN branché (bDNA). La détection résulte de l'émission de signaux lumineux provenant de la dégradation d'un substrat grâce à l'action d'une enzyme fixée sur une des sondes.

- ✓ **NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification)** : l'amplification par NASBA est une technique d'amplification des acides nucléiques pour la détermination de l'ARN viral, après une phase linéaire, avec l'action combinée de trois enzymes à savoir :
 - La reverse transcriptase (AMV-RT) permettant la synthèse d'une matrice d'ADN à partir d'ARN ou d'ADN ;
 - La RNase H permettant la dégradation de l'ARN de l'hybride ADN/ARN ;
 - La T₇ RNA Polymérase (contenant le promoteur T₇) permet la synthèse d'ARN à partir de la matrice d'ADN.

Seul, les laboratoires Biomérieux ont développé une trousse commerciale se basant sur cette technologie NASBA. Le test Nuclisens EasyQ HIV-1 Version 2.0, elle combine une extraction magnétique de l'ARN suivie d'une amplification isothermique (NASBA) et une détection en temps réel. Elle cible la séquence ***gag*** et permet la quantification aussi du VIH-1 que du VIH-2 dans une marge de 10 à plus de 100 000 000 copies/ml pour le plasma et de 500 à 21 000 000 copies/ml pour les DBS.

L'amplification thermique est couplée à une détection-quantification en temps réel de l'ARN. Cette détection se fait par les balises moléculaires portant un marqueur fluorescent et qui s'ouvrent en présence d'amplicons d'ARN. L'augmentation de la fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'ARN générée pendant cette réaction. En plus, il détecte le VIH-1 de groupe N, de groupe M de sous types : A, B, C, D, F, G, H, J, K et les formes circulantes CRF02_AG, CRF01_AE et CRF14_BG et le VIH-2.

Chapitre II : Traitement de l'infection à VIH

1. Les molécules antirétrovirales

Dès 1987, la première molécule antirétrovirale (ARV) a été mise sur le marché. Il s'agit de la Zidovudine ou AZT. Par suite de résistances établies du virus à la seule molécule d'AZT, plusieurs autres molécules sont aujourd'hui disponibles et utilisées en association. Les nouvelles molécules disponibles, ayant de plus des cibles virales différentes, ont permis d'obtenir des résultats très encourageants dans le cadre des associations thérapeutiques et d'améliorer considérablement l'évolution des patients.⁽¹⁴⁾ Ces molécules sont regroupées en quatre familles d'inhibiteurs actuellement :

- Des inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (IN)
- Des Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INN)
- Des inhibiteurs de protéases (IP)
- Des inhibiteurs de fusions (IF)
- Des inhibiteurs d'intégrase (IIN)

1.1. Les inhibiteurs nucléosidiques de la reverse transcriptase

Ce sont des analogues des nucléosides naturels dont ils diffèrent par l'absence de groupement l'hydroxyle en 3'. Ils agissent en compétition, après divers métabolismes, au niveau du site de polymérisation de l'enzyme et bloquent ainsi l'elongation de l'ADN. Ils agissent sur les deux types de virus : VIH-1 et VIH-2. Une variante de cette classe est représentée par les inhibiteurs nucléotidiques ne nécessitant pas toutes de métabolisme d'activation. Elle est représentée par le Ténofovir actif même sur les virus résistants à cette classe d'inhibiteurs nucléosidiques.⁽⁹⁵⁾

1.2. Les inhibiteurs non nucléosidiques de la reverse transcriptase

Non compétitifs, ils agissent sans métabolisme ou transformation préalables sur le site allostérique et modifient ainsi la conformation du site actif de la RT bloquant par ricochet sa fonction de polymérisation. Ils sont actifs uniquement sur le VIH-1.⁽¹³⁾

1.3. Les inhibiteurs de protéases (IP)

Ce sont des peptides synthétiques dont l'action peut être double : ils peuvent s'insérer au niveau du site catalytique ou à l'interface entre les deux sous-unités du dimère qui constitue l'enzyme et bloque ainsi son activité protéolytique de façon sélective et réversible.

La présence de cette IP empêche la maturation des précurseurs de protéines; ce qui bloque alors la formation de particules virales matures ou bien entraîne la formation de particules virales immatures et non infectieuses. ^(21, 96)

1.4. Les inhibiteurs de fusions et d'entrée (IF et IE)

Ces inhibiteurs agissent de manière à empêcher l'entrée du VIH dans la cellule hôte. Ils sont conçus de manière à bloquer les récepteurs de fusion dont le VIH se sert pour s'accrocher aux cellules. Il s'agit d'analogues de la chaîne transmembranaire CD4. ⁽¹¹⁰⁾

1.5. Les inhibiteurs de l'intégrase (IIN)

La classe des inhibiteurs de l'intégras, ou anti-intégras, comprend à l'heure actuelle quatre molécules ciblant l'enzyme intégras du VIH :

- le raltegravir (commercialisé sous la marque Isentress© mais également connu sous le nom de code MK-0518);
- l'elvitégravir (noms de code : GS 9137 ou bien JTK-303), en phase III;
- le dolutégravir (GSK-572 ou bien S/GSK1349572), en phase III;
- le MK-2048, apparemment abandonné.

Ces molécules bloquent l'intégration de l'ADN proviral au génome de la cellule infectée. ^(63, 114)

2. Le traitement

L'association recommandée comprend 3 ARV, ce traitement antirétroviral (ARV) ne fait que ralentir le processus de réplication du virus. Il ne bloque en aucun cas la réplication virale qui continue lentement avec la production de variants (étant donnée la grande variabilité génétique du virus) et par conséquent, une seule modification ponctuelle (mutation) peut parfois induire une résistance à une molécule antirétrovirale.

Le traitement a pour but essentiel de réduire considérablement et durablement la réplication virale. C'est généralement une association de deux inhibiteurs nucléosidiques de la

transcriptase inverse et un inhibiteur de la protéase. Mais il existe d'autres associations qui ont prouvé leur efficacité.

Dans les pays en développement les combinaisons de première ligne de traitement sont composées de deux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse et d'un inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse. Les associations avec inhibiteurs de protéase sont réservées pour les traitements de deuxième de ligne.

3. Prise en Charge des PVVIH au Sénégal

3.1. Présentation de l'ISAARV

L'ISAARV (Initiative Sénégalaise d'Accès aux Antirétroviraux), née d'une volonté gouvernementale, a été créé en 1998, dans un contexte où le consensus international préconisait dans les pays du Sud la prévention plutôt que le traitement du SIDA. La mise en place de programmes d'accès aux ARV (Antirétroviraux) mettait en avant un certain nombre de problèmes de santé publique, liés notamment (1) à l'insuffisance des connaissances scientifiques d'alors concernant l'efficacité de ces thérapies à long terme et dans les contextes sanitaires des pays du Sud, (2) la complexité de traitements devant à priori être poursuivis à vie et exigeant un suivi médical lourd, (3) à la nécessité d'un bon niveau de développement des infrastructures sanitaires pour la mise en place des traitements, (4) et ainsi qu'au coût des médicaments. Comme tout programme sanitaire, le programme d'accès aux ARV devaient faire la preuve qu'il pouvait souscrire aux quatre exigences de santé publique que sont : l'équité, un rapport coût-efficacité optimal, l'accessibilité et l'acceptabilité pour les populations concernées et la pérennité.

3.1.1. Historique

C'est dans ce contexte dubitatif que le gouvernement Sénégalais s'est fixé pour objectif de relever le défi que représente l'utilisation des ARV dans la prise en charge de l'infection par le VIH au sein des structures de soins Africains.

C'est ainsi que le Sénégal fut le 1^{er} pays d'Afrique Sub-saharienne à mettre en place un programme public de distribution de médicaments antirétroviraux sur la base d'un engagement gouvernemental, en créant « **l'Initiative Sénégalaise d'Accès aux ARV (ISAARV)** ».

L'expérience positive des trois premières années de fonctionnement du programme d'accès aux ARV, limitée à 3 sites Dakarois (le service de Médecine Interne de l'Hôpital Principal, le service des maladies infectieuses de l'Hôpital Fann et le centre de traitement

ambulatoire CTA) et à quelques centaines de bénéficiaires ont encouragé les pouvoirs publics dans leur engagement d'élargir l'accès au programme. Grâce à cette expérience positive, le CNLS a projeté l'extension du programme dans la région de Dakar et la décentralisation des sites de PEC dans les capitales régionales avec notamment le 1^{er} site décentralisé en région ouvert à Kaolack en 2001.⁽⁴⁾

L'inscription des ARV et des réactifs de dépistage dans la liste des médicaments essentiels ainsi que la gratuité des ARV et des examens immuno-virologiques ont été déterminants dans le processus de décentralisation. Les efforts de décentralisation déjà entrepris par le Gouvernement du Sénégal ont été renforcés dans le cadre de sa participation à l'Initiative « 3 en 5 » de l'OMS.⁽⁸⁸⁾

3.1.2. Réalisations jusqu'à ce jour

Au bout de ces 15 ans de fonctionnement, l'ISAARV présente un bilan plutôt positif avec la décentralisation de la PEC et de l'augmentation considérable des sites et un certain nombre de sites offrant un paquet complet (Conseil, Dépistage et ARV).

Selon le rapport de l'ONUSIDA 2012, la couverture universelle de TARV est définie par une couverture de trithérapie $\geq 80\%$. Le Sénégal quant à lui, présente un taux de 78%.⁽³⁾ Avec une couverture de 100% du test de dépistage au niveau des centres de santé et hôpitaux, et de 72% au niveau des postes de santé.

✓ Evolution des sites de PEC

Le programme de décentralisation de la dispensation des ARV a débuté en 2001 au niveau des hôpitaux régionaux, renforcée en 2003 par la gratuité des ARV, du dépistage du VIH et du taux de CD4, suite à une décision gouvernementale. Cette politique entre dans le cadre du Plan Stratégique National (PSN) 2002-2006.

D'après la figure 9, on note une augmentation de 106 sites de PEC entre les années 2002 et 2011.

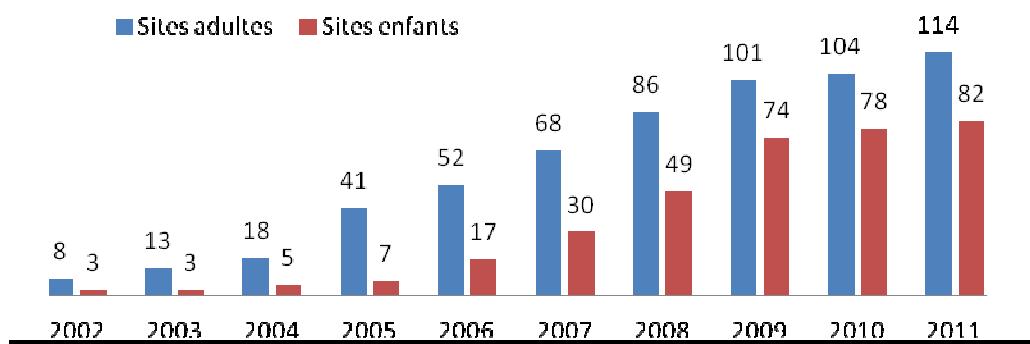


Figure 9 : Evolution des sites de PEC ⁽⁴⁾

✓ Evolution du nombre de patients sous ARV

En 2004, 74% des patients étaient prise en charge à Dakar. Depuis 2008 on note une inversion de la tendance avec plus de la moitié des patients suivi dans les régions. En 2011, 62% des patients sous ARV provenaient des régions. ⁽⁴⁾

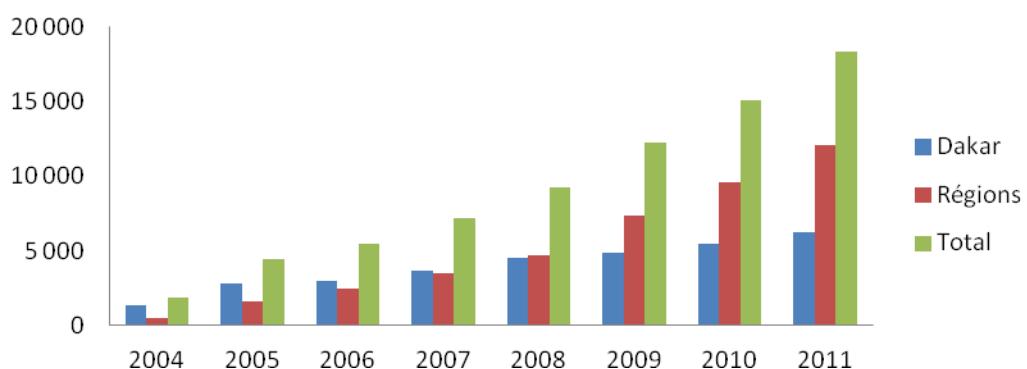


Figure 10 : Evolution du niveau de décentralisation de patients sous ARV ⁽⁴⁾

✓ Taux de couverture en ARV

Malgré les efforts consentis, la couverture des besoins en ARV reste encore modeste sur le plan national avec un taux de 78% en 2011. Ceci s'explique par l'augmentation considérable des patients à mettre sous TAR après les nouvelles recommandations de l'OMS ($CD4 < 350/\text{mm}^3$).

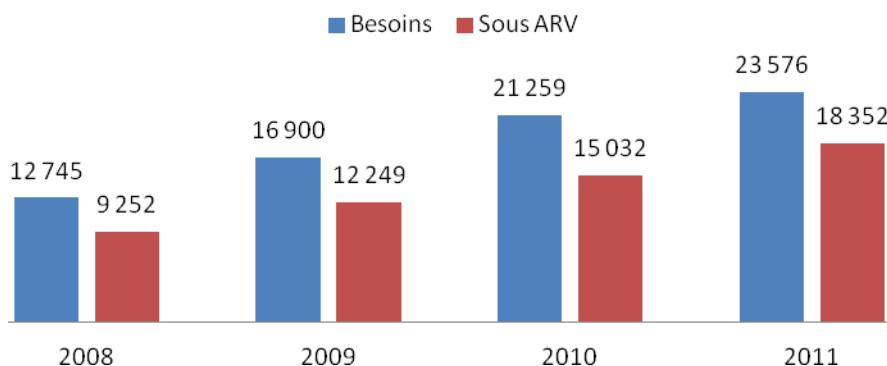


Figure 11 : Taux de couverture de mise sous ARV des PVVIH⁽⁴⁾

3.2. Prise en charge des PVVIH

Chez les patients dépistés positifs, les recommandations concernant le suivi biologique des PVVIH, se résument à un bilan biochimique (Transaminases, créatinémie et glycémie), un bilan hématologique avec un hémogramme complet, un suivi immunologique, un suivi virologique, un diagnostic des infections opportunistes, l'évaluation de la toxicité aux ARV, l'appréciation de la résistance aux ARV ; mais les plus importants sont le suivi immunologique et le suivi virologique.

Le suivi immunologique repose essentiellement sur la numération des Lymphocytes T CD4+ en utilisant essentiellement la technique de cytométrie en flux et un taux de CD4+ ≤ 350 cellules/mm³ (avec ou sans symptômes cliniques) est un critère de mise sous ARV.

Le traitement ARV administré est basé sur les recommandations de l'OMS. En 1^{ère} intention, il doit comporter un INNTI plus deux INTI dont l'un d'eux doit être la Zidovudine (AZT) ou le Tenofovir.

- AZT ou TDF + 3TC ou FTC + EFV+++ ou NVP
- Femmes enceintes : AZT + 3TC + EFV ou NVP+++ 1er trimestre de grossesse

En cas d'échec de la première ligne de traitement, le traitement de 2^{ème} intention doit associer un IP potentialisé par du Ritonavir et deux INTI dont l'un doit être l'AZT ou le TDF.

- TDF + 3TC ou FTC + ATV/r ou LPV/r
- AZT + 3TC ou FTC +ATV/r ou LPV/r

Sous traitement ARV, le suivi biologique des patients inclus également la détermination de la charge virale plasmatique pour apprécier l'efficacité du traitement et détecter au besoin les cas d'échec virologique précoce. Cette détermination est réalisée à la mise sous traitement pour avoir la charge virale de base, au bout d'un mois, à 6 mois puis tous les 6 mois. Le succès du traitement est donnée par une CVP indétectable c'est-à-dire <50 copies/ml après 6 mois de

TARV selon les recommandations du RESAPSI.⁽⁸⁷⁾ A l’opposé, une CVP supérieure à 1 000 copies/ml de façon répétée suggère une mauvaise observance du patient au traitement ou bien un échec thérapeutique qui amène à changer de schéma thérapeutique.

3.3. Utilisation du papier buvard comme support de prélèvement

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. Les travaux de GUTHRIE et GARRICK ont montré leur utilisation dans le dépistage des maladies métaboliques et génétiques chez le nouveau-né.^(42, 50)

Des études récentes montrent que les prélèvements DBS ont été largement utilisés ces dernières années dans le diagnostic sérologique^(52, 54, 76) et moléculaire^(56, 75) ainsi que dans le suivi virologique des PVVIH.^(60, 101)

Les nombreuses difficultés rencontrées au cours des prélèvements et traitements des échantillons veineux sur tube (prélèvement de sang invasif, volume de sang insuffisant, l’existence d’un seul 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.

Pour accompagner la prise en charge effective des PVVIH et de décentralisation des soins et du suivi virologique, le Gouvernement du Sénégal a opté pour des techniques alternatives tel que le papier buvard, permettant le démarrage et le suivi d’un traitement antirétroviral éventuel le plus rapidement possible.

➤ Propriétés du Papier buvard

Le papier buvard est un papier poreux capable d’absorber par capillarité une quantité de liquide. Plusieurs types de papiers sont utilisés dans la collecte et le transport des prélèvements de sang dont : le Whatman 903 (W-903), Ahlstrom Grade 226 (A-226), Munktell TFN (M-TFN), FTA etc. Selon l’étude de *Erin Rottinghaus et al, 2013*, des performances similaires ont été obtenues avec ces 3 types de papier buvard, pour la quantification de la charge virale mais le M-TFN a montré une efficacité supérieure pour le test de génotypage.⁽¹⁰⁰⁾

Le papier buvard utilisé doit avoir les propriétés suivantes: ^(60, 67, 79)

- la surface doit être lisse et résistante, sans fibre perdue ;
- doit être résistant aux acides et bases fortes ;
- doit avoir une composition en cendre quasi-inexistante (0,006%) ;
- fabriqué à partir de linters de coton et de cellulose ;
- doit avoir une certaine capacité de rétention et
- une résistante accrue à l'humidité.

➤ 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 ;⁽¹²¹⁾
- la stabilité des anticorps et de l'ADN dans le sang total sur papier buvard a été largement prouvée ;⁽¹²¹⁾
- 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 ;⁽¹²¹⁾
- les DBS ont été utilisés avec succès dans beaucoup de travaux pour la quantification de l'ARN viral.^(60, 67, 79)

DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL

Chapitre I : Contexte, Justificatifs et Objectifs de l'Etude

1. Contexte et Justificatifs de l'étude

Depuis l'avènement de la pandémie à VIH SIDA, la prévention a été érigée comme le meilleur moyen de lutte contre la pandémie. La prise en charge des personnes infectées est devenue ensuite une priorité de plus en plus pressante.

Les efforts consentis par le Gouvernement du Sénégal dans la prévention se sont traduites par une prévalence basse et stable (0,7%) et la volonté politique forte de l'Etat dans la prise en charge qui s'est traduite en 1998 par la mise en place d'un programme d'accès aux ARV dénommé ISARRV.

Au Sénégal, depuis le début de l'ISAARV, plusieurs trousse commerciales sont utilisées pour la quantification de l'ARN viral plasmatique du VIH, tel que le Cobas Taqman des laboratoires Roche, Abbott Real Time HIV-1 des laboratoires Abbott, le Quantiplex ou Versant HIV RNA bDNA 3.0 des laboratoires Siemens et le Nuclisens EasyQ HIV-1 Version 2 laboratoires Biomérieux.

Les laboratoires Biomérieux ont validé l'utilisation d'un volume de 100 μ l de plasma qui serait l'équivalent de 2 spots de DBS saturés chacun avec 50 μ l de sang total, pour quantifier la charge virale. Les valeurs obtenues avec 100 μ l de plasma et les 2 spots de DBS (saturés chacun avec 50 μ l de sang total) avec la version 1.2 ne présentent pas une différence statistiquement significative, les valeurs obtenues restant acceptables.⁽⁶⁰⁾

La version 2.0 du Nuclisens EasyQ HIV-1 récemment développer donne de meilleurs résultats que la version 1.2 tant avec le plasma qu'avec les spots de sang total séchés.⁽¹⁹⁾

Pour faciliter encore les prélèvements sur DBS, nous nous sommes proposé de comparer les valeurs des charges virales obtenues sur les prélèvements DBS avec différentes prises d'essai de sang total (50, 75, 100 et 150 μ l). Les valeurs des charges virales obtenues avec ces différents spots de sang séchés ont été par la suite comparées avec les valeurs obtenues avec 100 μ l de plasma, considéré comme référence. Ceci en vue d'identifier le volume de saturation de sang sur carte, qui corrèle le mieux avec 100 μ l de plasma.

2. Objectifs de l'Etude

2.1. Objectif général

L'objectif général de notre étude est de déterminer le meilleur volume de sang total à utiliser sur papier buvard pour la quantification de la charge virale.

2.2. Objectifs spécifiques

De façon spécifique dans cette étude nous allons :

- Déterminer la charge virale plasmatique et de différents DBS avec le Nuclisens EasyQ HIV-1 V2.0 en saturant le papier buvard avec différents volumes de sang total (50, 75, 100 et 150 µl) ;
- Comparer sur une trentaine d'échantillons de sang total, la charge virale sur DBS des différents volumes prédéfinis avec du plasma (100µl);
- Déterminer le volume de spot de sang ayant une meilleure corrélation avec le plasma (100µl).

Chapitre II : Matériel et Méthodes

1. Type d'étude

Il s'agissait d'une étude prospective et évaluative, qui consistait à quantifier la charge virale des personnes infectées par le VIH à J₀ de traitement antirétroviral.

2. Cadre de l'étude

Notre étude a eu pour cadre le Laboratoire de Bactériologie-Virologie du CHU Aristide Le Dantec, plus précisément au sein de son unité de Biologie Moléculaire.

Ce laboratoire hospitalo-universitaire a pour vocation le diagnostic biologique des infections bactériennes et virales, la recherche et la formation dans les domaines de la bactériologie et de la virologie.

C'est un centre de référence des IST et un centre collaborateur de l'ONUSIDA.

Il est le siège du Réseau Africain de Recherche sur le SIDA (RARS) et abrite en son sein l'observatoire des résistances aux antirétroviraux et le programme de recherche sur les vaccins anti-VIH en Afrique.

Institution partenaire du WAPHIR (West African Plateform for HIV intervention Research), il est également le siège de la WANETAM (West African noE for TB, AIDS and Malaria).

Le laboratoire est subdivisé en 5 unités techniques et 3 unités de soutien (un service administratif et financier, un service de maintenance et de métrologie, informatique et gestion des données).

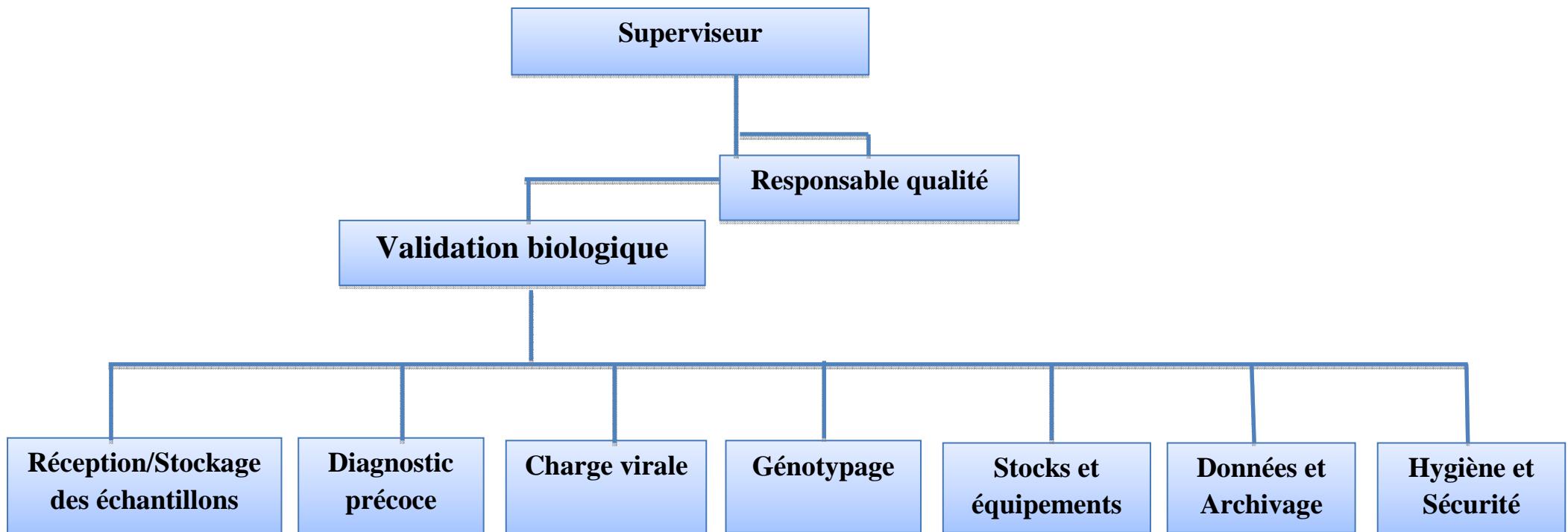
Les unités techniques sont :

- Unité de Bactériologie
- Unité de Virologie
- Unité de Biologie Moléculaire
- Unité d'Immunologie
- Unité d'essais et de recherches cliniques.

L'unité de Biologie Moléculaire créé en 1997, comporte 2 sections, la section Malaria et la section VIH.

La section VIH a pour missions le diagnostic moléculaire de l'infection à VIH et le suivi virologique des patients sous ARV dans le cadre de l'ISAARV, avec la détermination de

la charge virale plasmatique, la surveillance de la circulation de souches de VIH et la résistance acquise aux ARV des patients sous traitement. De même, l'unité s'occupe de recherches basées sur des études de cohortes, des essais thérapeutiques, le développement d'outils alternatifs de diagnostic et de suivi virologique des patients infectés par le VIH. Elle s'y intéresse également à la quantification de la charge virale des hépatites, le diagnostic moléculaire des IST à *Chamydia trachomatis / Neisseria gonorrhoeae* et le diagnostic précoce de l'infection chez les enfants nés de mères séropositives.



Organigramme fonctionnel de l'unité de Biologie Moléculaire

3. Echantillonnage

Notre étude a porté sur 31 échantillons de sang total de patients séropositifs, à J0 de TARV, provenant des sites de prise en charge des PVVIH de Dakar. Nous avons inclus dans notre étude, tout échantillon de 4ml de sang sur tube EDTA prélevé sur des patients J0, naïf de tout TARV, confirmés VIH-1 positif.

4. Matériel

4.1. Matériel d'usage général

- Hotte à flux laminaire (enceinte stérile de classe II) ;
- Micro pipettes de 10, 20, 200 et 1000µl ;
- Portoirs ;
- Agitateur à rouleaux avec action de balancement et de roulement pour assurer un mélange doux ;
- Embouts stériles avec et/ou sans filtre de 10, 20, 200 et 1000µl ;
- Pipette – Aide, Pipette 5ml et Pipette Pasteur ;
- Conteneur déchets à couvercle ;
- Cryotubes de 1,8 à 2 ml ;
- Micro tubes stériles de 1,5 ml et de 2 ml ;
- Bain – marie ;
- Agitateur de type vortex ;
- Centrifugeuse ;
- Chronomètre ;
- Gants jetables sans talc ;
- Tubes de 5 et 15 ml avec bouchons ;
- Sarrau ou blouse de laboratoire propre ;
- Essuie-tout ;
- Pissette d'éthanol 70% ;
- Burette graduée
- Pissette d'eau de javel (10% d'hypochlorite de sodium) ;
- Eau distillée ;
- Papier buvard : Whatman 903 (**Proteinsaver TM 903® Card**) ;

- Sachet de déssicant (sachet de sorbant MiniPax® de 2 grammes, MultiSorb Technologies) ;
- Congélateur – 80°C et réfrigérateur +4°C.

4.2. Réactifs et équipements pour la technologie Nuclisens EasyQ HIV-1 V 2.0

4.2.1. Extraction

Les équipements et réactifs utilisés pour la réaction d'extraction sont les suivants :

- Les tubes de lyse contenant 2ml de Lysis Buffer ;
- L'agitateur horizontal ;
- Les peignes et les navettes ;
- Le portoir des navettes ;
- Le vortex ;
- Les tampons d'extraction : Nuclisens EasyMAG Buffer 1, 2 et 3 ;
- La silice magnétique Nuclisens EasyMAG ;
- Le contrôle interne et le diluant Nuclisens EasyMAG ;
- L'automate Nuclisens EasyMAG.

4.2.2. Amplification et détection

Pour la réaction d'amplification – détection, les équipements et réactifs utilisés sont les suivants :

- Les barrettes avec les bouchons ;
 - Le portoir des barrettes ;
 - L'incubateur Nuclisens EasyQ ;
 - Le vortex ;
 - La centrifugeuse des mini barrettes ;
 - L'analyseur Nuclisens EasyQ ;
 - Les enzymes (EnzII) ;
 - Le diluant d'enzymes (Enzdil H) ;
 - Les amores (PRM H) ;
 - Le diluant d'amorce (PRMdil H).
- 
- Kit Nuclisens EasyQ HIV-1V 2.0

Les réactifs doivent être conservés entre 2 et 8°C.

5. Méthodologie de l'étude

5.1. Vérification de l'identification et attribution d'un numéro

A l'arrivée des prélèvements, le réceptionniste – archiviste du laboratoire ou alors le responsable de la séparation procède à une vérification de la conformité du bulletin de demande d'analyses ainsi que la conformité du prélèvement (sang prélevé sur tube EDTA, un minimum de 4 ml de sang par tube, 2 tubes de sang par patient du programme ISAARV).

Après vérification de la conformité du bulletin et du prélèvement, un code (numéro interne) unique est attribué. C'est ce code qui est utilisé du début du processus jusque la fin des analyses effectués pour chaque prélèvement.

5.2. Préparation des spots et conservation

Chaque carte de papier buvard (W-903) pour chaque patient à J0 est remplie avec les informations suivantes : le numéro d'identification interne, la date, le volume de sang de saturation (50, 75, 100, 150µl).

Pour chaque patient, 6 cartes de DBS sont préparées après homogénéisation du tube de sang. Sur la 1^{ère} carte de papier buvard, 50 µl de sang total sont déposés dans les 5 anneaux de la carte et sur la 2^{ème} carte, 75 µl de sang total sont également déposés dans les 5 anneaux. Pour les volumes de saturation de 100 et 150 µl, 2 cartes sont utilisés pour chaque volume et seules 3 anneaux sont saturés, espacés chacune d'un anneau vide. Ceci dû au fait que le dépôt avec ces volumes, déborde la surface de l'anneau.



Figure 12 : Photographies des cartes de DBS avec les différents volumes déposés

Les spots ainsi réalisés sous la hotte sont séchés à température ambiante jusqu'au lendemain, puis sont emballés dans des sacs de glycine zippés contenant des sachets de déssicants et conservés à – 80°C jusqu'à leur utilisation.



Figure 13 : Photographie d'un sac zippé prêt pour la conservation ou pour l'envoi

5.3. Séparation lymphocytaire et conservation

Après confection des spots, le reliquat de sang total contenu dans le tube est centrifugé à 2500 tours / min pendant 10 minutes. Le plasma des échantillons ainsi obtenu est alors aliquoté (sous la hotte) dans les cryotubes de 2ml. Les aliquots de plasma sont conservés à – 80°C jusqu'à leur utilisation.

5.4. Découpe des DBS et lyse

A leur sortie du congélateur – 80°C, les cartes doivent être découpées et lysées dans l'heure.

➤ **Principe de la réaction de lyse**

La réaction se fait à l'aide du Tampon de lyse Nuclisens® Lysis Buffer (contenant principalement du thiocyanate, < 2% de Triton X-100, < 1% EDTA) qui est utilisé pour la libération totale des acides nucléiques des échantillons biologiques. Tous les acides nucléiques présents dans l'échantillon sont libérés suite à une lyse des particules virales ou matières cellulaires contenues dans l'échantillon. Les Rnases et les Dnases présentes dans l'échantillon seront désactivées. ⁽¹²⁾

➤ Mode opératoire

A l'aide d'un Puncheur 12 calibré certifié CE des laboratoires Biomérieux, 2 spots de chaque carte (de différents volumes) ont été découpés (les spots obtenus ont un diamètre de 12 mm) et placé dans les tubes de Lysis Buffer Nuclisens contenant 2ml de solution de lyse.

Les tubes Lysis Buffer de Nuclisens (conservation entre 2 – 30°C) sont préalablement incubés au bain marie à 37°C, afin de dissoudre d'éventuels cristaux de Guanidine formés. Pour chaque échantillon, la découpe se fait avec des cartes de volume croissant (50 à 150µl). Entre deux coupes de spots d'échantillons différents, le puncheur est décontaminé en découpant 2 à 3 fois du papier stérile.

Les tubes Lysis Buffer sont déposés sur un agitateur horizontal à rouleaux pendant 30 min, en prenant la précaution que les spots soient toujours en contact avec la solution de lyse. Cette étape permet la lyse des éléments cellulaires permettant ainsi la libération de l'ADN viral.



Figure 14 : Photographie des tubes de lyse sur l'agitateur horizontal

Après 30 min d'agitation horizontale, les tubes sont centrifugés à 1500 tours pendant 15 s, ceci en vue de faire descendre liquide au fond du tube.

Un embout (sans filtre) de 100 µl fixé sur l'embout avec filtre de 5 ml, permet transférer les lysats dans les navettes du Nuclisens EasyMAG, en évitant de pipeter les particules de papier, et en laissant un reliquat de ± 50 µl de lysat au fond du tube afin d'éviter de transférer la mousse.

Les lysats peuvent être conservés à – 80°C pour un délai maximal d'1 mois, ou pendant 14 jours à + 4°C au max ou bien à température ambiante pendant 24h, mais jamais à – 20°C car il en résulte une gélification de la solution de lyse qui gênera l'étape d'extraction.

5.5. Extraction – Amplification et détection par la technologie Nuclisens EasyQ HIV-1 V2.0

L'extraction du matériel génétique se fait grâce à l'automate de Nuclisens EasyMAG des laboratoires Biomérieux et l'amplification détection est faite avec l'analyseur EasyQ.

5.5.1. Extraction des acides nucléiques sur l'automate EasyMAG

➤ **Principe de la réaction d'extraction :**

La réaction d'extraction est faite par la chimie de Boom, qui est basée sur le pouvoir fixateur de la silice magnétique vis-à-vis des acides nucléiques. Cette réaction est réalisée grâce à une série de réactifs : la silice, le tampon de lavage 2, le tampon de lavage 3 et le tampon d'éluion.

Dans les conditions de salinité élevée, La silice magnétique fixe les acides nucléiques présents dans la solution de lyse. Elle a une capacité de fixation 20 supérieure à la silice ordinaire. Ces particules de silice agissent comme une phase solide et les composants étrangers aux acides nucléiques sont retirés après plusieurs étapes de lavage dans le Nuclisens EasyMAG ; enfin les acides nucléiques sont élués dans la phase solide.

A la fin de l'étape, un pur concentré d'ARN est obtenu au fond de la navette.

Extraction Principle

- A. During incubation of the lysed samples, all the target nucleic acid is captured by magnetic silica particles.
- B. The NucliSENS easyMAG magnetic device attracts all the magnetic silica, enabling the system to purify the nucleic acids through several washing steps.
- C. The heating step releases the nucleic acids from the silica.
- D. At the final step, the magnetic silica particles are separated from the eluate by the magnetic device.

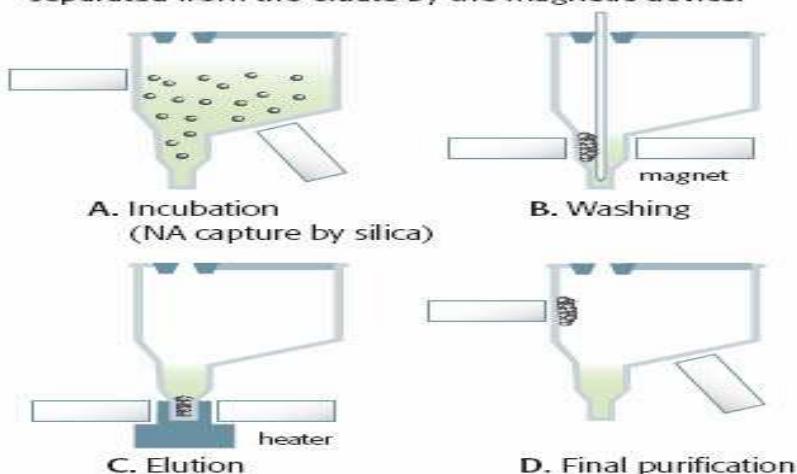


Figure 15 : Schéma de l'extraction sur Nuclisens EasyMAG

➤ Mode opératoire

Après maintenance de l'automate, une liste de la série de travail est créé avec les numéros des échantillons au niveau de l'automate Nuclisens EasyMAG, en sélectionnant comme protocole d'extraction HIV-1 2.0, en indiquant le type de prélèvement (primaire ou lysé), la matrice de l'échantillon (plasma ou sang total) et le volume de l'éluat (25µl).

Les peignes et les navettes sont placés dans l'appareil, puis 2 ml de solution de lysat sont déposés (ceci pour chaque échantillon de DBS) dans chaque puit de la navette. Par ailleurs, 100 µl de plasma (pour chaque échantillon) sont déposés dans le puit de la navette. La lyse du plasma est réalisée par l'automate Nuclisens EasyMAG en 10 min.

Après ajout de 100 µl du mix préparé extemporanément (contrôle interne + silice) dans chaque puit, l'appareil procède à l'extraction du matériel génétique. Cette étape dure environ 40 min.

Dans les 5min suivant la fin de l'extraction, les extraits doivent être transférés dans les barrettes EasyQ, car la silice présente sur la paroi du puit risque de se désagréger et de tomber dans l'extrait ce qui inhibera la réaction d'amplification.

Ce sont 15 µl d'extrait qui sont déposés dans ces barrettes en vérifiant l'absence de bulles d'air et le même niveau de volume de solution pour chaque puit de la barrette.

5.5.2. Amplification et détection par la technologie Nuclisens EasyQ HIV-1 V2.0

➤ Principe de la réaction d'amplification

La réaction d'amplification par NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) consiste en une amplification d'acide nucléique combinée à une étape de détection simultanée.

L'amplification des acides nucléiques sur Nuclisens EasyQ® HIV-1 v2.0 utilise des amorces qui sont spécifiques des séquences détectées de l'ARN du VIH-1 de type sauvage (WT) et de l'ARN du calibrateur synthétique de Nuclisens EasyQ® HIV-1 v2.0. Cet ARN du calibrateur ne diffère de l'ARN du VIH-1 WT que par une petite séquence nucléotidique qui permet les mêmes cinétiques d'amplification. Tout ARN du VIH-1 WT présent dans les acides nucléiques élués est co-amplifié avec le calibrateur interne. Les autres séquences d'acides nucléiques ne seront pas amplifiées. L'amplification NASBA® est basée sur un processus répété d'accrochage d'amorce, une formation d'ADN double brin contenant un promoteur T7 et une transcription facilitée par l'ARN polymérase T7 de plusieurs copies antisens des séquences cibles d'ARN WT et d'ARN calibrateur (amplicons).⁽³⁰⁾

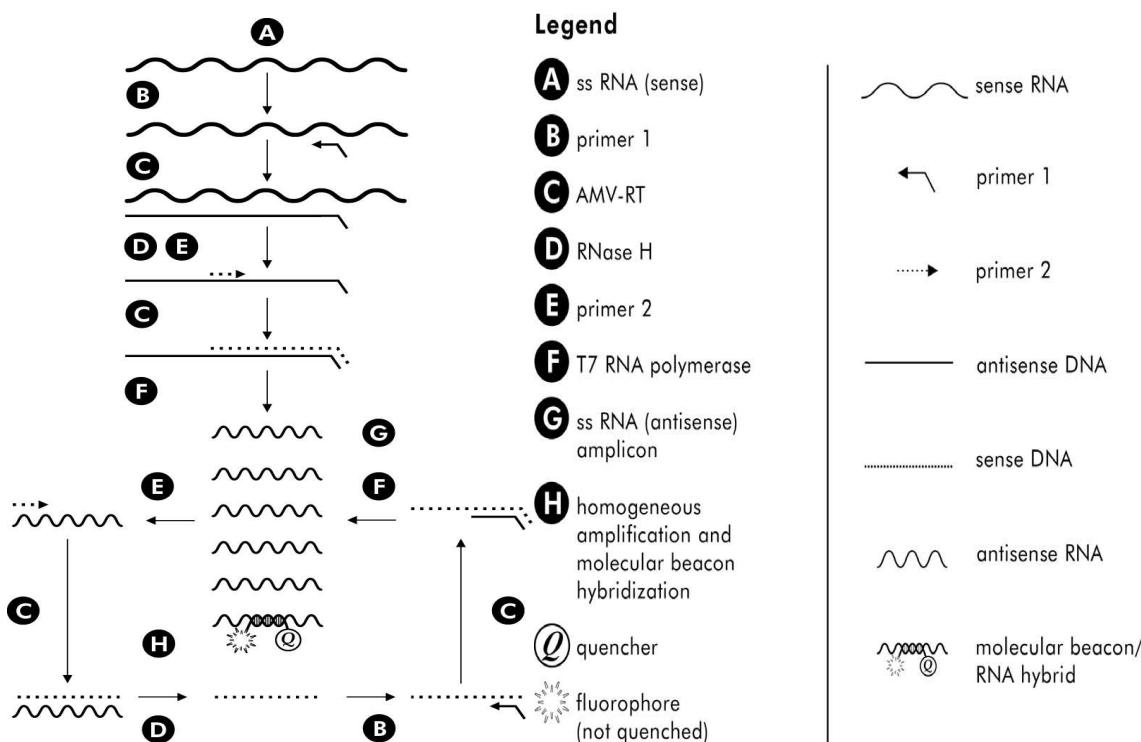


Figure 16 : Principe de la réaction d'amplification par NASBA.

➤ Principe de la réaction de détection

Le processus de détection du test Nuclisens EasyQ® HIV-1 v2.0 utilise des balises moléculaires spécifiques de la cible.

Une balise moléculaire est un oligonucléotide d'ADN comprenant une séquence nucléotidique spécifique qui reconnaît une séquence d'ARN cible particulière, couplée à un fluorophore et à un quencher. En l'absence d'ARN complémentaire, la balise moléculaire restera dans une structure interne en épingle à cheveu ; le quencher reste alors à proximité du fluorophore. La conséquence sera l'extinction de la fluorescence de la balise moléculaire. En présence d'une séquence « cible » complémentaire, la balise s'ouvre et émet une fluorescence, ce qui indique la présence de la séquence cible.^(118, 119)

L'utilisation de deux fluorophores différentes permet de suivre simultanément la synthèse de la cible WT et de l'ARN du calibrateur. L'analyse cinétique des signaux fluorescents permet de dégager les vitesses de transcription de la cible WT et de l'ARN du calibrateur. Elle permet de déduire la quantité d'ARN du VIH-1 dans l'échantillon de plasma/DBS (prélèvements de sang total EDTA) de départ.^(35, 112, 126) La charge virale peut alors être mesurée à l'aide d'un algorithme de réduction des données dans le logiciel de test Nuclisens EasyQ® HIV-1 v2.0⁽¹²²⁾

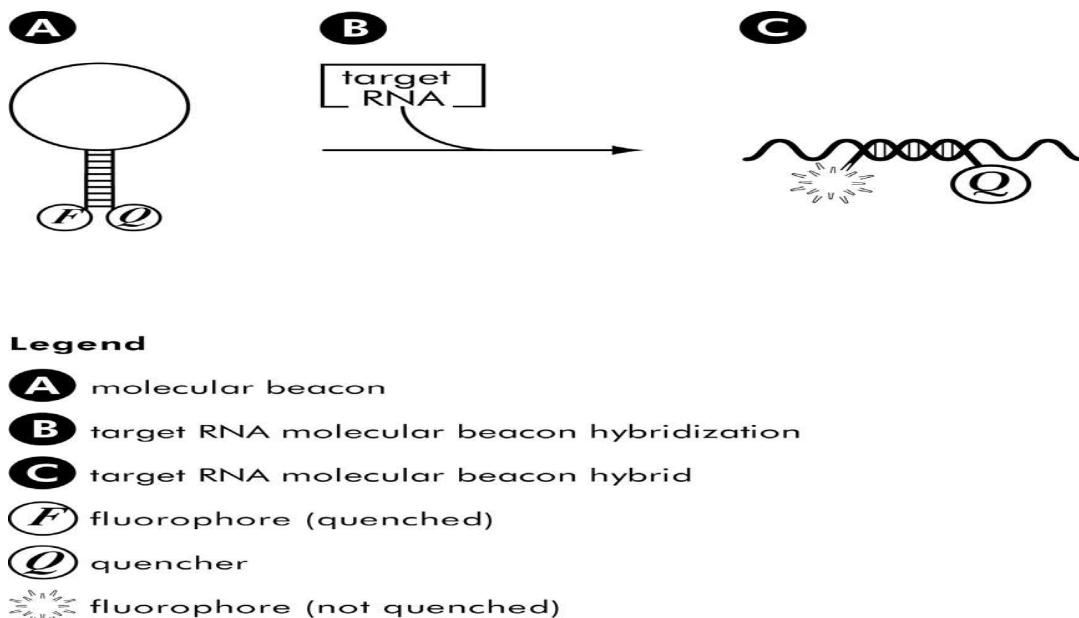


Figure 17 : Principe de la détection par les balises moléculaires

➤ Mode opératoire

Sur l'analyseur EasyQ, une série de travail avec les numéros des échantillons est préparée en choisissant le protocole de dosage HIV-1 2.0, en indiquant le volume de l'échantillon (100 µl) et la matrice de l'échantillon (plasma ou DBS).

La reconstitution de l'enzyme est réalisée en ajoutant 45 µl de diluant enzyme à l'enzyme lyophilisée (un lyophilisat d'enzyme correspond à 8 échantillons) puis laisser reposer 15 min avant utilisation.

La préparation de la solution d'amorce se fait en ajoutant 180 µl de diluant d'amorce aux amorces lyophilisées (2 dans chaque tube) en mélangeant immédiatement au vortex jusqu'à obtention d'une solution claire (ne pas utiliser une solution qui contient un précipité). La solution doit être utilisée dans les 30 min. Chaque tube d'amorces correspond à l'amplification de 8 échantillons.

20 µl de solutions d'amorces reconstituée sont déposés dans chaque puit de la barrette qui est sur un portoir dans l'incubateur Nuclisens EasyQ®, qui est ensuite recouverte d'un couvercle et démarrage du programme (2 min à 65°C, 2min à 41°C).

Après les 15 min d'attente pour l'enzyme reconstituée, 5 µl de la solution enzymatique sont déposés dans chaque bouchon.

A l'issue de la dernière étape d'incubation (2 min à 41°C), les barrettes sont fermées avec les bouchons (contenant la solution enzymatique) à l'aide d'un accessoire de fermeture puis les barrettes sont identifiées de façon unique.

Le contenu des barrettes fermées est homogénéisé en fouettant les barrettes, puis centrifugation pendant 2 secondes dans la centrifugeuse mini barrettes.

Les portoirs de barrettes sont ensuite chargées dans l'analyseur Nuclisens EasyQ® avant la mise en marche de la réaction d'amplification – détection.

La réaction d'amplification basée sur la technologie NASBA qui cible la région du gène **gag** dure une heure de temps. A la fin de la réaction, les résultats s'affichent et il est possible de vérifier l'absence d'erreur (No Amplification, Poor Amplification, insufficient liquid etc.). Les résultats de la série seront exportés sur Microsoft Excel pour exploitation statistique des résultats.

6. Analyse statistique des résultats

La comparaison des résultats a été faite après transformation des valeurs de charge virale en log.

Le logiciel Microsoft Excel 2010, a permis de faire la conversion des résultats de la charge virale en valeur logarithmique décimale, ainsi que le calcul des différences de log.

Le logiciel MethVal a permis d'obtenir les tracés de la droite de régression et les analyses de concordance entre les valeurs des charges virales du plasma-DBS et entre différents prélèvements DBS.

La corrélation ou la régression linéaire consiste en présence de deux variables quantitatives, à tester l'hypothèse de l'existence d'une relation de proportionnalité entre elles. Divers types de renseignements sont fournis par la régression linéaire. En premier lieu, le coefficient r de Pearson évalue le degré de linéarité de la relation testée, son carré (R^2) représentant le pourcentage de variabilité expliquée par le modèle linéaire, plus la valeur du r est proche de 1 plus les 2 techniques sont corrélées. La pente et l'ordonnée à l'origine de la droite sont fournies par le calcul de la meilleure droite possible (selon la méthode des moindres carrés), passant au sein du nuage de points. Ces caractéristiques de la droite sont très utiles pour prédire, si la technique à tester s'avère valable.⁽⁴⁸⁾

La concordance de Bland et Altman consiste à apprécier l'écart observé (biais) entre les valeurs obtenues par une technique de référence par rapport à une technique à tester et les limites de concordance qui représentent les écarts des valeurs d'une technique par rapport à l'autre.

La concordance permet d'apprécier l'écart observé entre les 2 valeurs obtenues pour la mesure et d'en déduire, sur l'ensemble de la population observée, le biais, la précision, et les limites de l'intervalle de confiance à 95% afin de statuer sur la concordance des 2 séries de valeurs.

Les limites de concordance correspondent à un biais +/- 2 Ecart-Type (ou déviation standard) qui représente la moyenne de l'écart systématique d'une série de valeurs par rapport à l'autre. standard) et entre lesquelles se trouvent 95% des valeurs de différences.

Le principe de la méthode de Bland et Altman consiste à réaliser un graphe étudiant en ordonnée la différence entre les valeurs obtenues par les deux techniques A et B (soit $A - B$) et en abscisse la moyenne des valeurs obtenues par ces deux techniques, soit $(A + B)/2$. Plus la valeur du biais tend vers zéro, plus la concordance est meilleure.⁽⁴⁸⁾

TROISIEME PARTIE : EXPLOITATION DES RESULTATS

Chapitre I : Résultats

1. Résultats de la charge virale plasmatique

Notre étude évaluative a porté sur 31 échantillons de patients naïfs de traitement antirétroviral, ceci afin d'avoir des valeurs de charge virale élevées, qui permettraient une analyse statistique plus aisée.

Les valeurs de charge virale détectables variaient entre 670 et 2 700 000 copies/ml soit, converties en valeurs logarithmiques, entre 2,83 log et 6,43 log. Quatorze échantillons avaient une CV très élevée ($> 5 \text{ log}$) et 11 avec une CV élevée (entre 4 et 5 log).

Pour faciliter les analyses et se conformer à l'interprétation classique des résultats de charge virale, nous les avons classés en valeur faible, moyenne, élevée et très élevée. Ainsi les 31 échantillons se répartissent comme présenté dans le tableau I suivant.

Tableau I : Répartition des échantillons en fonction des valeurs de CVP

Classification des CV	Intervalles de valeurs (en copies/ml)	Intervalles de valeurs (en log)	N
Faible	100 – 1000	2 – 3 log	2
Moyenne	1000 – 10 000	3 – 4 log	4
Elevée	10 000 – 100 000	4 – 5 log	11
Très élevée	$> 100 000$	$> 5 \text{ log}$	14
Total			31

2. Comparaison globale des valeurs de CVP avec les DBS

La comparaison des valeurs de charges virale plasmatique des différents échantillons de DBS a été réalisée en calculant leur différence de log avec le plasma.

Globalement quel que soit le volume de sang déposé, 12 échantillons ont présenté une discordance entre plasma et DBS avec une différence de log comprise entre 0.51 et 1. Parmi ces 12 échantillons, 6 ne sont discordants que pour un seul volume de DBS dont 3 pour les DBS 150, 4 sont discordants pour plus de 2 volumes et 2 sont discordants pour plus de 3 volumes de sang déposé sur carte (voir tableau en annexe).

Le résumé du tableau global des résultats est présenté dans le tableau II ci-dessous.

Tableau II : Différences de log entre plasma et les différents volumes sur DBS

Différence de log	$\Delta\log \text{Pl-DBS_50}$	$\Delta\log \text{Pl-DBS_75}$	$\Delta\log \text{Pl-DBS_100}$	$\Delta\log \text{Pl-DBS_150}$
$\Delta\log \leq 0,5$	25	26	27	25
$0,5 < \Delta\log \leq 1$	6	5	4	6

Comme le montre le tableau pour chacun des volumes de sang déposé sur les cartes, la majorité des échantillons (entre 25 et 27) présente des résultats concordants avec une différence de log en valeur absolue inférieure à 0,5 c'est-à-dire non significative.

Le nombre d'échantillons discordants ($\Delta\log > 0,5$ en valeur absolue) ne varie pas beaucoup (entre 4 et 6) selon le volume de sang déposé :

- ✓ 6 échantillons sur 31 (19,35%) pour la valeur du $\Delta\log$ entre le plasma et DBS_50
- ✓ 5 échantillons sur 31 (16,13%) pour la valeur du $\Delta\log$ entre le plasma et DBS_75
- ✓ 4 échantillons sur 31 (12,9%) pour la valeur du $\Delta\log$ entre le plasma et DBS_100
- ✓ 6 échantillons sur 31 (19,35%) pour la valeur du $\Delta\log$ entre le plasma et DBS_150.

3. Analyse des discordances plasma DBS vs en fonction des valeurs de CVP

Les échantillons présentant des discordances ont une charge virale plasmatique qui varie entre 670 et 750 000 copies/ml.

Tableau III : Répartition des échantillons en fonction des $\Delta\log$ Plasma vs DBS en valeur absolue

CV en log	$\Delta\log \text{Pl-DBS_50}$		$\Delta\log \text{Pl-DBS_75}$		$\Delta\log \text{Pl-DBS_100}$		$\Delta\log \text{Pl-DBS_150}$	
	$\leq 0,5 \text{ log}$	$> 0,5 \text{ log}$	$\leq 0,5 \text{ log}$	$> 0,5 \text{ log}$	$\leq 0,5 \text{ log}$	$> 0,5 \text{ log}$	$\leq 0,5 \text{ log}$	$> 0,5 \text{ log}$
2 – 3 log	2	0	2	0	2	0	1	1
3 – 4 log	4	0	4	0	4	0	4	0
4 – 5 log	8	3	7	4	7	4	8	3
>5 log	11	3	13	1	14	0	12	2

Nous observons que les discordances sont notées essentiellement avec des échantillons dont les valeurs sont supérieures à 4 log. Seul 1 échantillon de charge virale plasmatique en dessous de 4 log (670 copies/ml) présente une discordance; celle-ci est observée uniquement pour un dépôt de 150 μ l de sang sur carte.

Pour tous les 12 échantillons correspondant à 21 discordances vis-à-vis du plasma, les valeurs des CVP sont supérieures à celles obtenues avec les différents volumes de DBS.

4. Droite de régression linéaire et concordance plasma vs DBS

4.1. Régression linéaire et concordance Plasma vs DBS_50

L'analyse de la droite de régression linéaire entre les valeurs de charge virale de 100 μ l de plasma et 2 spots de 50 μ l de sang déposés sur carte a donné la droite de régression suivante avec un coefficient de corrélation linéaire **R= 0,955 et une pente à 1.013**.

Le graphe de Bland-Altman qui compare les valeurs de DBS_50 à 100 μ l de plasma a donné un biais négatif mais faible de **-0,24 [- 0,346 à 0,135]** avec 4 échantillons sur les 31 soit 12,9% qui sortent de l'intervalle de confiance (95%) en dessous de la limite inférieure. De plus, la majorité des échantillons sont concentrés en dessous de la ligne basale montrant une légère sous-estimation de la charge avec le DBS_50.

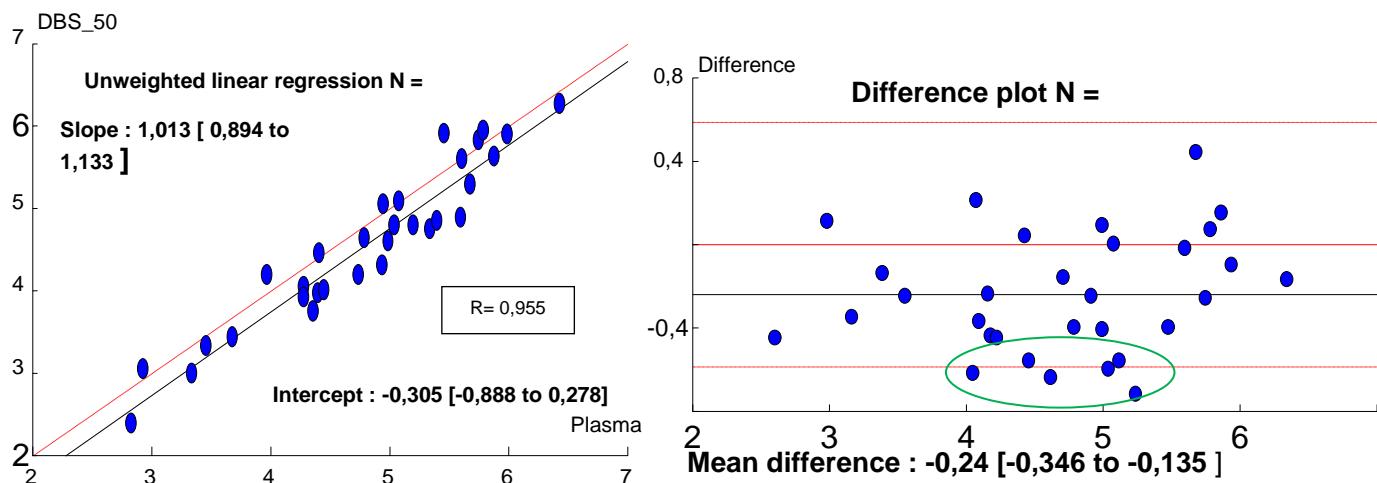


Figure 18 : Droite Régression et Bland-Altman Plasma vs DBS_50

4.2. Régression linéaire et concordance Plasma vs DBS_75

L'analyse de la droite de régression linéaire entre les valeurs de charge virale de 100 μ l de plasma et 2 spots de 75 μ l de sang déposés sur carte a donné la droite de régression suivante avec une bonne corrélation avec un coefficient **R=0,956 et une pente à 1.000**.

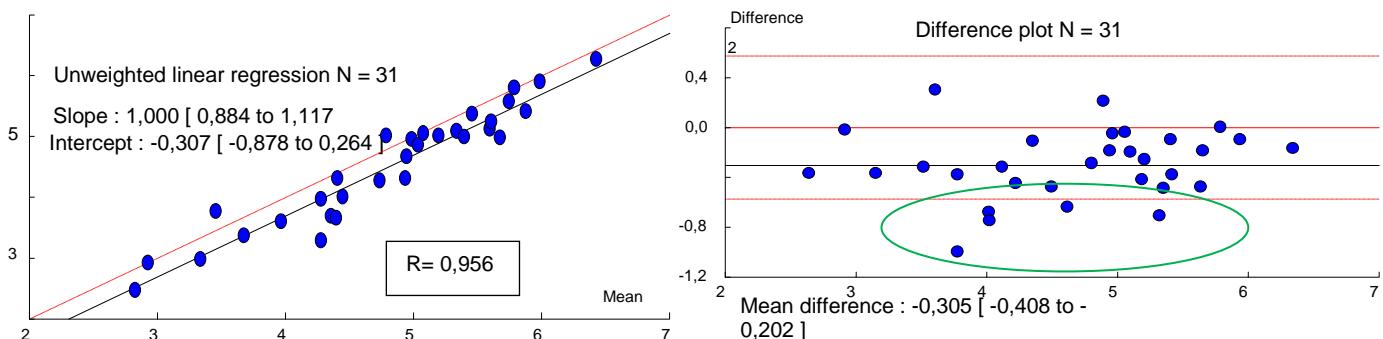


Figure 19 : Droite de régression et Bland-Altman Plasma vs DBS_75

Le graphe de Bland-Altman qui compare les valeurs de DBS_75 à 100 μ L de plasma a donné un biais négatif mais faible de **-0,305 (-0,878 à 0,264)** avec 5 échantillons sur les 31 soit 16.13% qui sortent de l'intervalle de confiance (95%) en dessous de la limite inférieure. De plus, la majorité des échantillons sont concentrés en dessous de la ligne basale montrant une légère sous-estimation de la charge avec le DBS_75.

4.3. Régression linéaire et concordance Plasma vs DBS_100

L'analyse de la droite de régression linéaire entre les valeurs de charge virale de 100 μ L de plasma et 2 spots de 100 μ L de sang déposés sur carte a donné la droite de régression suivante avec une bonne corrélation avec un coefficient **R=0,968 et une pente à 1,017**.

Le graphe de Bland-Altman qui compare les valeurs de DBS_100 à 100 μ L de plasma a donné un biais négatif mais faible de **-0,254 (-0,343 à 0,165)** avec 4 échantillons sur les 31 soit 12,9% qui sortent de l'intervalle de confiance (95%) en dessous de la limite inférieure. De plus, la majorité des échantillons sont concentrés en dessous de la ligne basale montrant une légère sous-estimation de la charge avec le DBS_100.

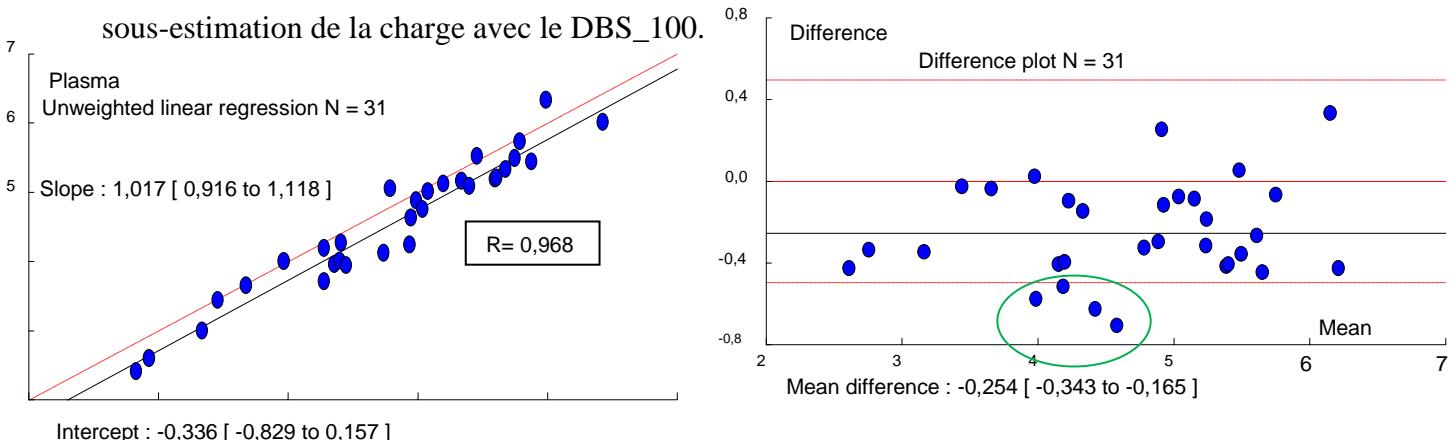


Figure 20 : Droite de régression et Bland-Altman Plasma vs DBS_100

4.4. Régression linéaire et concordance Plasma vs DBS_150

L'analyse de la droite de régression linéaire entre les valeurs de charge virale de 100 μ l de plasma et 2 spots de 150 μ l de sang déposés sur carte a donné la droite de régression suivante avec une bonne corrélation avec un coefficient **R=0,952 et une pente à 1.032**

Le graphe de Bland-Altman qui compare les valeurs de DBS_150 à 100 μ L de plasma a donné un biais négatif mais faible de **-0,268 (-0,379 à 0,157)** avec 4 échantillons sur les 31 soit 12,9% qui sortent de l'intervalle de confiance (95%) en dessous de la limite inférieure. De plus, la majorité des échantillons sont concentrés en dessous de la ligne basale montrant une légère sous-estimation de la charge avec le DBS_100.

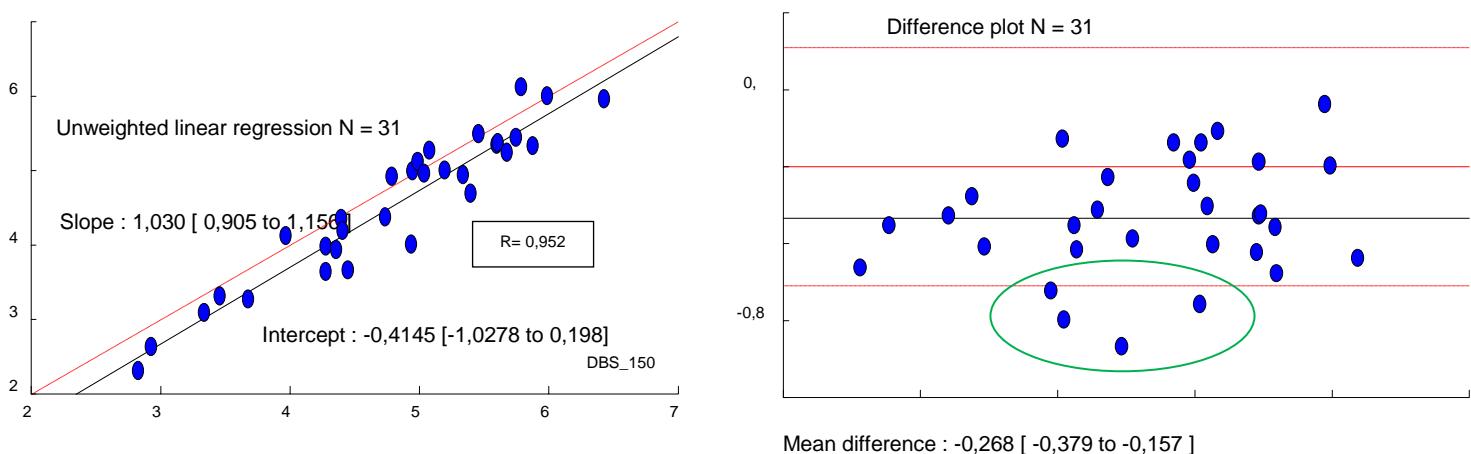


Figure 21 : Droite de régression et Bland-Altman Plasma vs DBS_150

5. Comparaison des valeurs de charge virale obtenues sur DBS

Globalement quel que soit le volume de sang déposé considéré, 6 discordances correspondant à 5 échantillons ont été notées entre les différents volumes de DBS avec une différence de log en valeur absolue comprise entre 0,69 et 0,76. Parmi ces 5 échantillons, 1 seul présentait une discordance pour 2 volumes (DBS_50/75 et DBS_75/150) soit un total de 6 échantillons discordants (voir tableau en annexe 1).

Le résumé du tableau global des résultats des comparaisons entre différents volumes de DBS est présenté dans le tableau IV ci-dessous.

Tableau IV : Répartition des différences de log en valeur absolu entre les DBS en fonction de leur concordance

Différence de log	$\Delta\log 50-75$	$\Delta\log 50-100$	$\Delta\log 50-150$	$\Delta\log 75-100$	$\Delta\log 75-150$	$\Delta\log 100-150$
$\Delta\log \leq 0,5$	28	31	30	31	29	31
$0,5 < \Delta\log \leq 1$	3	0	1	0	2	0

Les discordances notées concernent les volumes de DBS_50 vs DBS_75 (n=3), DBS_50 vs DBS_150 (n=1) et DBS_75 vs DBS_150 (n=2). Aucune discordance n'a été notée pour les DBS_50 vs 100, DBS_75 vs 100 et DBS_100 vs 150.

6. Analyse des discordances DBS vs DBS en fonction des valeurs de CVP

Les discordances observées se répartissent entre les différentes valeurs de charge virale à l'exception des valeurs faibles (comprises entre 2 et 3 log) avec 2 échantillons discordants entre 3 et 4 log, 3 discordants entre 4 et 5 log et 1 échantillon discordant au-delà de 5log.

Tableau V : Répartition des DBS présentant des discordances en fonction des valeurs log de CVP

CV en log	$\Delta\log$ DBS 50-75		$\Delta\log$ DBS 50-150		$\Delta\log$ DBS 75-150	
	$\leq 0,5$ log	$> 0,5$ log	$\leq 0,5$ log	$> 0,5$ log	$\leq 0,5$ log	$> 0,5$ log
2 – 3log	2	0	2	0	2	0
3 – 4log	3	1	4	0	3	1
4 – 5log	10	1	10	1	10	1
>5 log	12	1	14	0	14	0

7. Droite de régression linéaire et concordance entre les prélèvements DBS

7.1. Régression linéaire et concordance DBS_50 vs DBS_75

L'analyse de la droite de régression linéaire entre les valeurs de charge virale des spots de 50 µl vs 75 µl de sang déposés sur carte montre sur la droite de régression une dispersion assez importante de quelques points ; ce qui donne un coefficient de corrélation **R=0,956 avec une pente à 0,943.**

Le graphe de Bland-Altman qui compare les valeurs de DBS 50 vs DBS 75 a donné un biais négatif mais très faible de **-0,0645 (-0,169 à 0,0402)** avec 1 échantillon sur les 31 soit 3,25% qui sortent de l'intervalle de confiance en dessous de la limite inférieure. La valeur négative du biais témoigne d'une sous-estimation par le DBS 75 mais celle-ci est extrêmement faible.

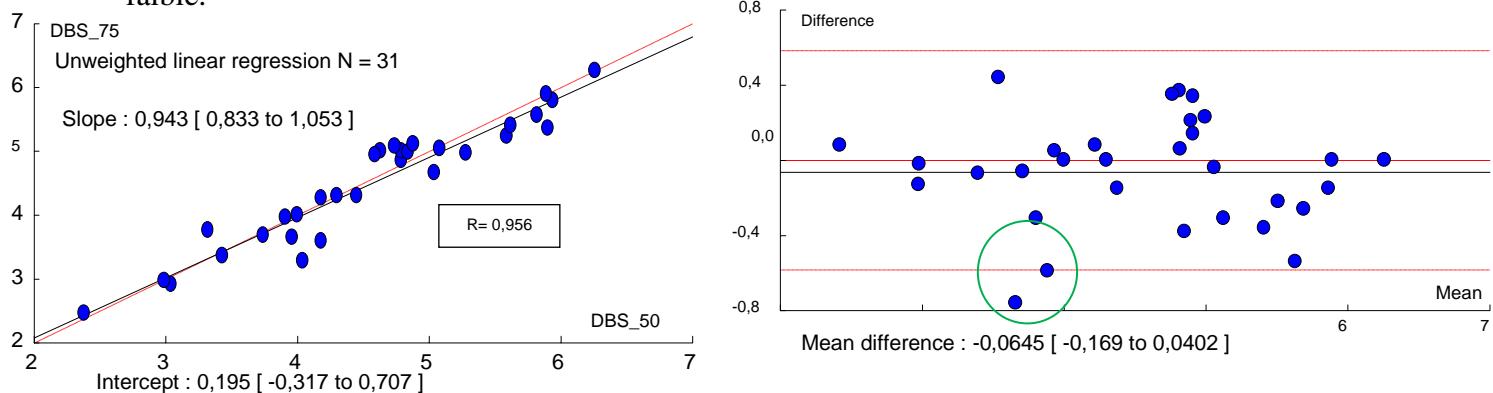


Figure 22 : Droite de régression et Bland-Altman DBS_50 vs DBS_75

7.2. Régression linéaire et concordance DBS_50 vs DBS_100

L'analyse de la droite de régression linéaire entre les valeurs de charge virale des spots de 50 µl vs 100 µl de sang déposés sur carte montre une bonne corrélation avec un coefficient de **R=0,961 avec une pente à 0,952**.

Le graphe de Bland-Altman correspondant a donné un biais négatif mais très faible de **-0,0139 (-0,113 à 0,0851)** avec aucun échantillon en dehors de l'intervalle de confiance.

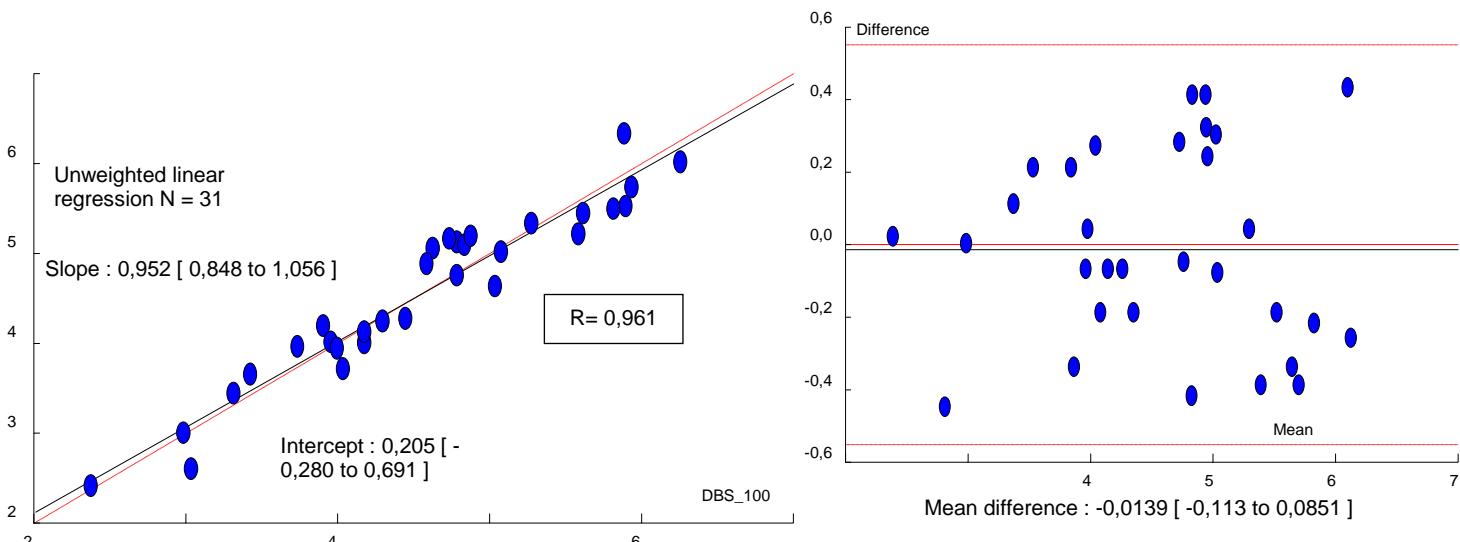


Figure 23 : Droite de régression et Bland-Altman DBS_50 vs DBS_100

7.3 Droite de régression linéaire et concordance DBS_50 vs DBS_150

L'analyse de la droite de régression linéaire entre les valeurs de charge virale des spots de 50 µl vs 150 µl de sang déposés sur carte montre une bonne corrélation avec un coefficient de **R=0,962 avec une pente à 0,981**.

Le graphe de Bland-Altman qui compare les valeurs de DBS 50 vs DBS 150 a donné un biais négatif mais très faible **de 0,0369 (-0,0615 à 0,135)** avec 1 échantillon sur les 31 soit 3,25% qui sortent de l'intervalle de confiance en dessous de la limite inférieure. La valeur du biais est positive témoignant d'une très légère sur-estimation par le DBS.

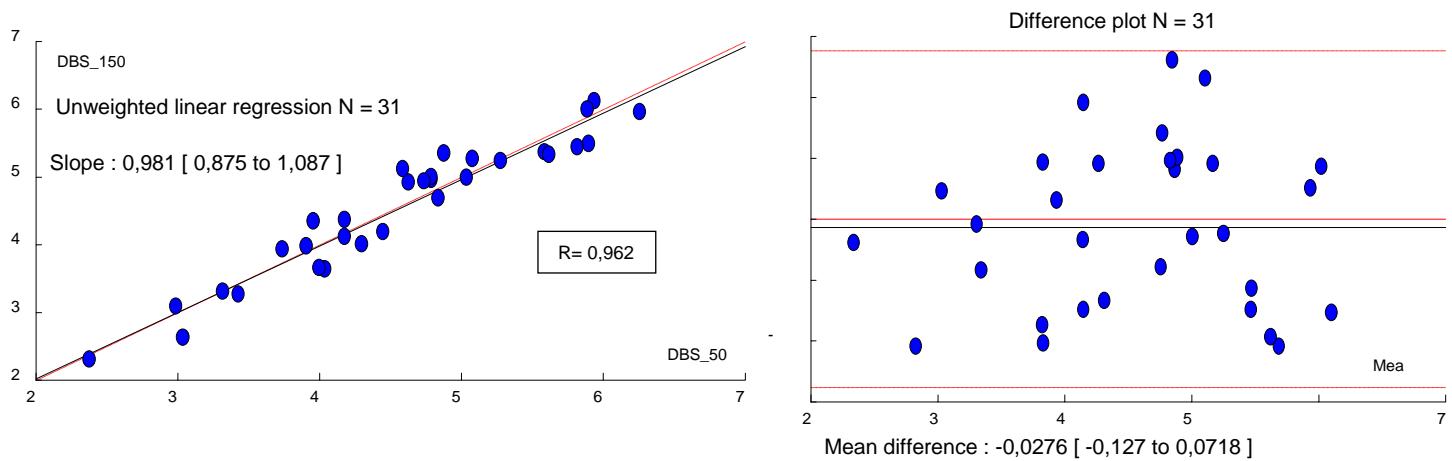


Figure 24 : Droite de régression et Bland-Altman DBS_50 vs DBS_150

7.4. Régression linéaire et concordance DBS 75 vs DBS 100

L'analyse de la droite de régression linéaire entre les valeurs de charge virale des spots de 75 µl vs 100 µl de sang déposés sur carte montre une bonne corrélation avec un coefficient de **R=0,977 avec une pente à 0,981**.

Le graphe de Bland-Altman correspondant a donné un biais négatif mais très faible de **0,0506 (-0,0255 à 0,127)** avec 2 échantillons à la limite supérieure de l'intervalle de confiance.

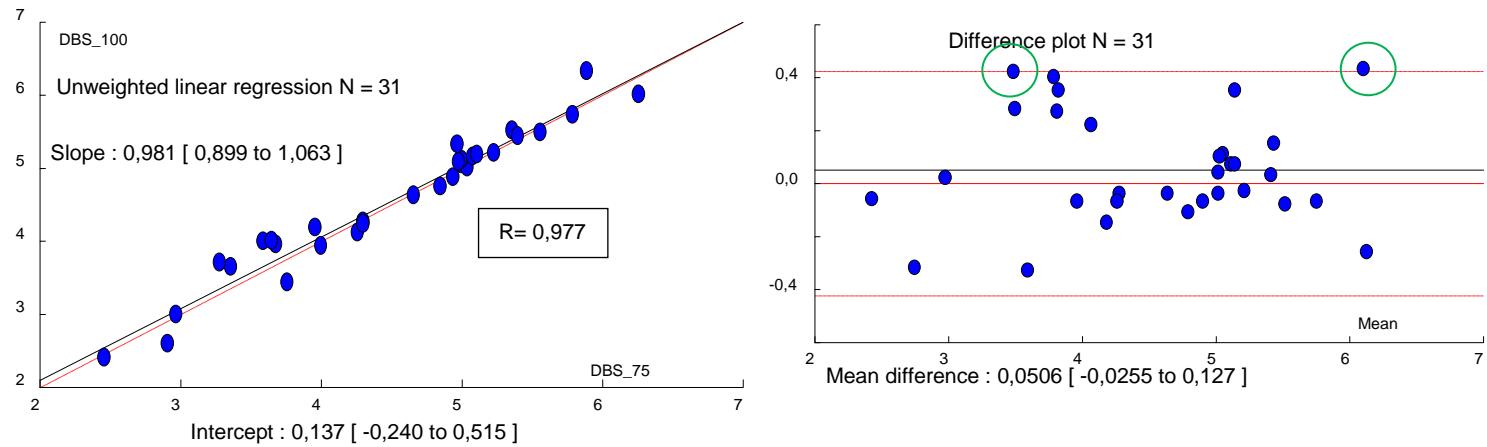


Figure 25 : Droite de régression et Bland-Altman DBS_75 vs DBS_100

7.5. Droite de régression linéaire DBS 75 vs DBS 150

L'analyse de la droite de régression linéaire entre les valeurs de charge virale des spots de 75 µl vs 150 µl de sang déposés sur carte montre une bonne corrélation avec un coefficient de **R=0,963 avec une pente à 0,995**.

Le graphe de Bland-Altman qui compare les valeurs de DBS_75 vs DBS_150 a donné un biais négatif mais très faible **de 0,0369 (-0,0615 à 0,135)** avec 1 échantillon sur les 31 soit 3,25% qui sortent de l'intervalle de confiance en dessus de la limite supérieure. La valeur du biais est positive témoignant d'une très légère sur-estimation par le DBS_150.

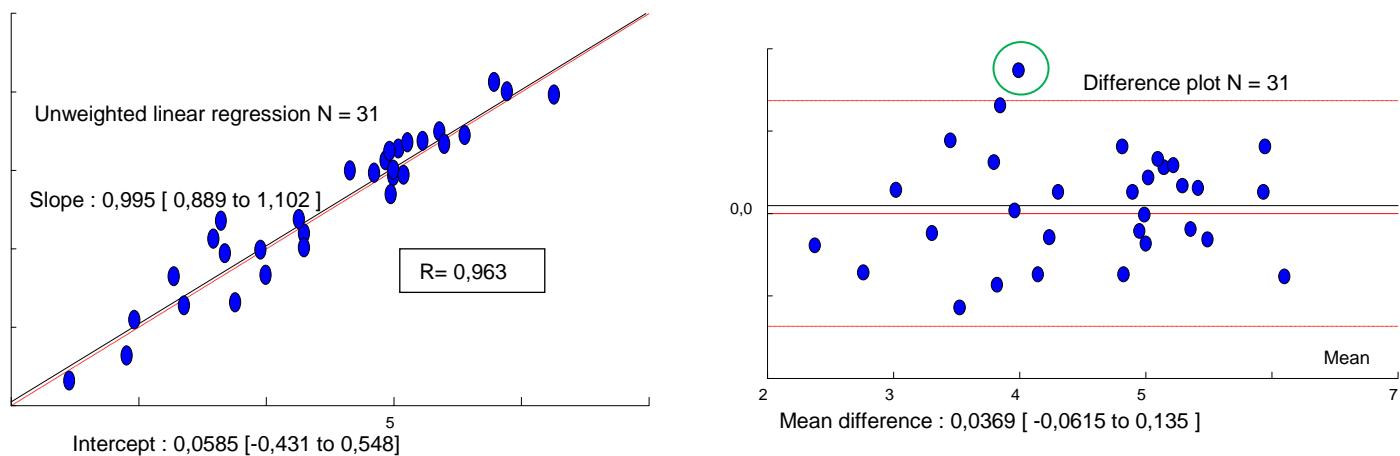


Figure 26 : Droite de régression DBS_75 vs DBS_150

7.6. Ligne de régression linéaire DBS_100 vs DBS_150

L'analyse de la droite de régression linéaire entre les valeurs de charge virale des spots de 100 µl vs 150 µl de sang déposés sur carte montre une bonne corrélation avec un coefficient de **R=0,975 avec une pente à 1.004**.

Le graphe de Bland-Altman correspondant a donné un biais négatif mais très faible de **-0,137 (-0,0938 à 0,0664)** avec aucun échantillon en dehors de l'intervalle de confiance.

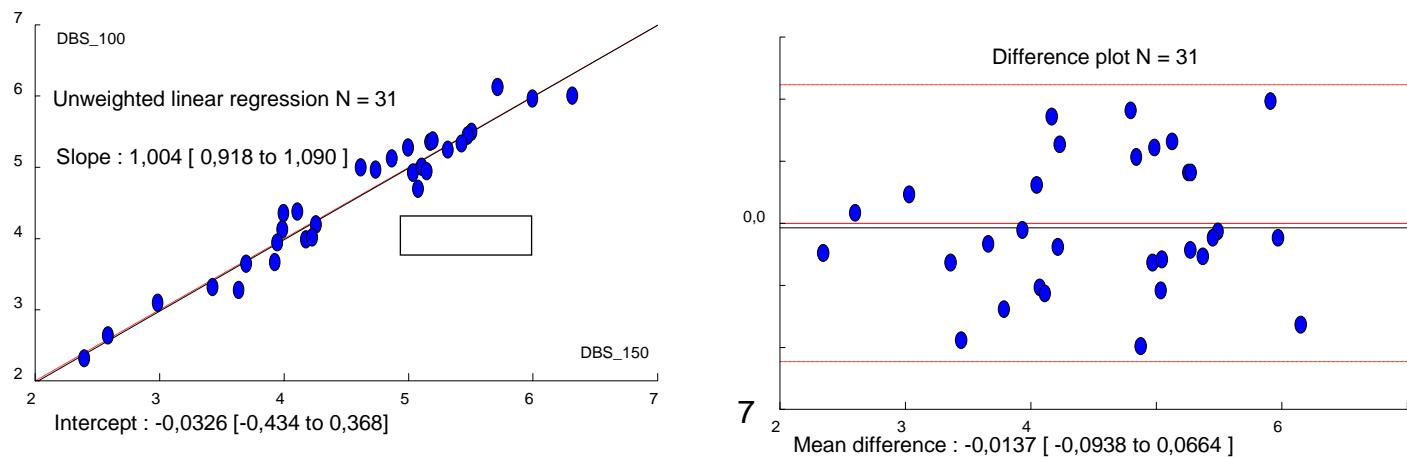


Figure 27 : Droite de régression et Bland-Altman DBS_100 vs DBS_150

Discussion

1. Utilisation du papier buvard et de la technologie NucliSENS

Le suivi virologique des PVVIH en zone décentralisée dans les pays à ressources limitées fait face à de nombreuses difficultés liées entre autres au nombre limité d'infrastructures adéquates et à des problèmes de logistique. Parmi ces contraintes logistiques on peut citer :

- la difficulté de conservation du plasma du fait d'un manque de source d'énergie fiable et de réfrigération
- la labilité de l'ARN viral qui impose une séparation lymphocytaire et une conservation du plasma dans les 6 heures qui suivent le prélèvement.

Depuis la première validation de l'utilisation du papier buvard pour la quantification de la charge virale avec une technique commerciale (NucliSENS EasyQ v1.2) décrite par **Kane et coll. 2008**, de nombreux travaux ont rapporté l'utilisation des DBS aussi bien pour la charge virale que le génotypage de résistance.⁽⁶⁰⁾

Le papier Whatman 903 que nous avons testé est celui qui est le plus couramment utilisé et les travaux récents de **ROTTINGHAUS, E. et coll.** ce qui confirme sa grande qualité en comparaison avec 2 autres types de papier buvard commercialisés (Ahlstrom Grade A-226 et Munktell TFN) pour la réalisation des DBS en vue de la charge virale. Cependant pour le test de génotypage, les DBS réalisés sur le papier filtre M-TFN a une plus grande efficacité et apparaît plus sensible dans la détection des mutations majeures de résistance du VIH.⁽¹⁰⁰⁾

La technique de NucliSENS sur DBS version 1.2 a fait l'objet d'une évaluation en zone rurale en Tanzanie par **Johannessen, A. et coll.** qui avait montré une bonne performance sur DBS pour le suivi des patients recevant un TARV. Cependant sa sensibilité est réduite lorsque la charge virale était faible.⁽⁵⁷⁾

Mais cette technique a évolué et **Van DEURSEN, P. et coll.**, en 2010 montré que la version 2.0 utilisée dans notre travail présentait également d'excellentes performances sur DBS lorsque les conditions de transport et de conservation étaient respectées.⁽¹²⁰⁾

Ces résultats ont été confirmés au Sénégal avec les travaux de **Touré-Kane, C. et coll.** qui a comparé les performances du Nuclisens EasyQ HIV-1 V2.0 à celles du Nuclisens EasyQ HIV-1 V1.2. Elle a montré que cette V2.0 était plus précise et fiable pour la quantification de la charge virale du VIH-1 par rapport à la version 1.2 en termes de spécificité et de sensibilité

mais aussi qu'elle présentait une bonne corrélation et une bonne concordance sur le plasma et sur DBS.⁽¹⁹⁾

Cette technique a également fait l'objet de comparaison avec de nombreuses autres techniques commerciales.

Sur le papier buvard, les comparaisons avec le m2000rt des laboratoires Abbott ont montré de bonnes corrélations sur différentes populations :

- **Garrido, C et coll. en 2009** en Espagne qui a comparé les résultats de charge virale de 103 échantillons de sang, collectés et séchés sur papier buvard 903 et a obtenu une bonne corrélation ($R=0,87$) avec la version 1.1 de NucliSENS.⁽⁴³⁾
- **ARREDONDO, M. et coll. en 2012 en Espagne** a retrouvé une corrélation entre plasma et DBS de $R=0,91$ ($P<0,001$).⁽⁶⁾
- **David S et coll.** réalisé dans le Sud de l'Inde en 2012, a comparé les valeurs des charges virales obtenues parallèlement sur plasma et DBS sur 62 patients et a obtenu une corrélation $R=0.9818$ ⁽³⁴⁾

Sur le plasma, **Xu, S. et coll.** ont comparé en 2010 les performances du Nuclisens EasyQ V2.0 avec six méthodes commerciales (*Cobas Amplicor HIV-1 Monitor V1.5 ('Amplicor')*, *Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 test V1.0 ('CAP/CTM')*, *Versant HIV-1 RNA V3.0 (branched DNA [bDNA]-based assay; 'Versant bDNA')*, *Abbott Real Time HIV-1 assay ('Abbott Real Time')*, *Nuclisens HIV-1 QT, et Nuclisens EasyQ HIV-1 V1.1*) de quantification de la charge virale du VIH-1. Dans l'ensemble, EasyQ V2.0 présentait une corrélation significative et une concordance élevée avec les six autres techniques.⁽¹²⁵⁾

En 2012, **Xu, S. et coll.** ont comparé les technologies Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 v2.0 et sa version 1 avec la technologie Nuclisens HIV-1 EasyQ v2.0 pour la mesure de la charge virale des divers génotypes de VIH-1 en Chine. Nuclisens EasyQ v2.0 et CAP/CTM v2.0 a montré une excellente détection des échantillons du sous-type B mais des différences significatives ont été observées pour tester les échantillons de sous -type non B.⁽¹²⁴⁾

2. La méthodologie

Notre travail a porté sur 31 échantillons mais 5 comparaisons différentes ont été réalisées avec 100 µl de plasma et 4 volumes différents de sang (50µl, 75µl, 100 et 150µl) déposés sur le papier buvard soit une total de 155 échantillons analysés.

Les spots de DBS ainsi que la séparation lymphocytaire ont été réalisés dans l'heure après réception des échantillons puis conservés à – 80°C dans les sacs de glycine avec des sachets de déssicants jusqu'à leur utilisation.

Dans les autres travaux, le volume de dépôt est généralement de 50µl mais dans le travail de **ROTTINGHAUS, E.** le volume déposé était de 100 µl.⁽¹⁰⁰⁾

De même la température et le temps de conservation n'est pas toujours la même dans les différents travaux :

- conservation à 37°C pendant 8 et 15 jours pour **Toure-Kane, C. et coll.**,⁽⁶⁰⁾
- conservation à -20°C pour **ARREDONDO, M. et coll.** jusqu'à utilisation.⁽⁶⁾
- conservation à 80°C dans l'étude de **ROTTINGHAUS, E. et coll.** jusqu'à utilisation.⁽¹⁰⁰⁾

Comme dans la plupart des travaux publiés, le Puncheur calibré 12 des laboratoires Biomérieux, nous a permis d'obtenir des spots de 12 mm de diamètre correspondant à la totalité de l'anneau sur le papier buvard. Cependant pour les volumes 100 et 150µl, les spots obtenus ne correspondent pas à toute la surface de la tache de sang déposé car le dépôt réalisé avec ces volumes débordent largement la surface de l'anneau de la carte.

3. Les résultats

3.1. Plasma vs DBS

Les résultats de charge virale des plasmas obtenus varient entre 670 et 2 700 000 copies/ml soit compris entre 2 log et > 5 log. Quatorze échantillons avaient une charge très élevée et onze une charge virale élevée.

La différence de log des valeurs des charges virales obtenues avec les plasmas et différents DBS nous montre 12 échantillons discordants mais que le nombre de discordances est quasiment le même quelque le volume considéré. De même, les moyennes des différences sont à peu près similaires avec -0.24 pour le DBS_50, -0.305 pour DBS_75, -0.254 pour DBS_100 et -0.268 pour DBS_150.

Cependant, les résultats du Bland-Altman (Plasma *vs* DBS 50 ; Plasma *vs* 150) montrent 4 échantillons sortant de l'intervalle de confiance en dessous de la limite inférieure, avec des biais de – 0,24 [- 0,346 à - 0,135] et – 0,268 [-0,379 à - 0,157]. Ces 4 échantillons sont ceux qui s'éloignent le plus du biais. Leurs droites de régression linéaire ont respectivement comme coefficient 0,955 et 0,952.

Le résultat du Bland-Altman entre Plasma *vs* DBS 75 montre 5 échantillons hors de l'intervalle de confiance avec un biais de – 0,305 [- 0,408 à - 0,202] en dessous de la limite inférieure. Sa droite de régression linéaire a un coefficient R = 0,956.

Le résultat du Bland-Altman entre Plasma *vs* DBS 100 montre 4 échantillons hors de l'intervalle de confiance avec un biais de – 0,254 [- 0,343 à - 0,165] en dessous de la limite inférieure. Sa droite de régression linéaire a un coefficient R = 0,968.

Néanmoins, les valeurs des ΔLog en valeur non absolue entre le plasma et les différents DBS confirment comme le plasma comme meilleur matrice pour la quantification de la charge virale, mais que les valeurs sur le DBS ne sont pas très éloignées.

3.2. DBS *vs* DBS

Les résultats de la charge virale obtenus sur différents DBS montrent 6 discordances correspondantes à 5 échantillons. Pour un échantillon, la discordance a été noté entre DBS 50 *vs* 75 et DBS 75 *vs* 150.

Les discordances ne sont notées que pour les valeurs de CVP > à 3 log et notamment entre les DBS 50 *vs* 75, DBS 50 *vs* 150 et DBS 75 *vs* 150. Ceci pourrait être lié au faible nombre d'échantillons à CVP < 3log.

Cependant, le Bland-Altman DBS 50 *vs* 75 montre un échantillon hors de l'intervalle de confiance, en dessous de la limite inférieure avec un écart très grand du biais qui est de – 0,0645 [- 0,169 à 0,402]. Sa droite de régression linéaire a un coefficient de 0,956.

Le Bland-Altman DBS 75 *vs* 150 montre un échantillon hors de l'intervalle de confiance, en dessus de la limite supérieure avec un biais de 0,0369 [- 0,069 à 0,135]. Sa droite de régression linéaire a un coefficient de 0,963.

Aucune discordance n'a été noté pour les volumes DBS 50 *vs* 100, DBS 75 *vs* 100 et DBS 100 *vs* 150.

La comparaison des moyennes des différences montre une différence extrêmement faible entre les volumes et que le DBS_100 (-0.0139) est celui qui est le plus proche du DBS_50.

CONCLUSION

Le VIH est le virus responsable de la pandémie mondiale du SIDA, qui touche de nos jours plus de 34 millions de personnes à travers le monde avec plus de 1,7 millions de décès par an. L'Afrique demeure toujours la région du monde la plus touchée avec plus de 23,5 millions de personnes vivant avec le VIH-SIDA.

Depuis la découverte du VIH en 1983, des efforts considérables ont été déployés pour le diagnostic, la prévention et la PEC des PVVIH. C'est grâce à ces efforts que le rapport de l'ONUSIDA 2012 a fait état d'une chute de 21% du taux annuel de nouvelles infections entre 1997 et 2010.

L'accessibilité du TARV a également permis la réduction des nouvelles infections mais aussi du nombre de décès annuel lié au VIH-SIDA grâce au développement de programmes d'accès aux ARV comme le programme ISAARV au Sénégal, qui a permis d'améliorer la qualité de vie des PVVIH. Ce programme prend en charge le suivi virologique des patients en plus de la mise sous TARV si l'indication est posée.

Ce suivi virologique au cours du TARV est nécessaire pour évaluer l'état d'immunodépression du malade et apprécier la réponse au traitement. Cependant, au Sénégal comme dans la plupart des pays à ressources limitées, le taux de CD4 est disponible même en zone décentralisée, alors que la charge virale et le génotype ne sont disponibles que dans le laboratoire de référence. L'accessibilité de ce marqueur reste un challenge majeur du processus de décentralisation du suivi virologique des PVVIH.

Cette inaccessibilité est due au coût élevé (50 à 100 USD par test), le nombre limité d'infrastructures adéquates, le défaut de personnel qualifié et la logistique (difficultés liées au transport et à la conservation des prélèvements sur tube). L'utilisation du papier buvard pour le prélèvement de sang dans le suivi virologique a été approuvée par l'OMS, ce qui permet de faire les prélèvements en zone décentralisée et de les envoyer au niveau de laboratoire. Ce transport des prélèvements DBS au niveau central a été validé pour un délai maximum de 15 jours sans perte significative d'ARN viral. La plupart d'études de charge virale sur DBS ont rapportées la validité de l'utilisation de 2 spots de 50µl de DBS (de 12mm de diamètre) pour la quantification de la charge virale, et c'est dans ce contexte que cette étude a été menée avec pour objectif d'évaluer l'impact du volume de sang déposé sur le papier buvard, sur la valeur de la charge virale mesurée. Elle a eu pour cadre l'unité de Biologie moléculaire du Laboratoire Bactériologie-Virologique A. Le Dantec. L'étude évaluative a porté sur 31 patients naïfs de traitement antirétroviral, ceci afin d'avoir des valeurs de charge virale élevées, qui permettraient une analyse statistique plus aisée. Des DBS de différents volumes de sang total ont été réalisés sur le papier buvard Whatman 903, avec 6 cartes pour chaque échantillon (1

carte chacune pour les volumes 50 et 75 μ l et, 2 cartes pour les 100 et 150 μ l). La référence a été le plasma et les valeurs de charge virale plasmatique détectables variaient entre 670 et 2 700 000 copies/ml soit, converties en valeurs logarithmiques, entre 2,83 log et 6,43 log. Pour faciliter les analyses et se conformer à l'interprétation classique des résultats de charge virale, elles ont été classées en valeur faible, moyenne, élevée et très élevée. Ainsi quatorze échantillons avaient une CVP très élevée (> 5 log), 11 avec une CVP élevée (entre 4 et 5 log), 2 avec une CVP faible (< 3 log) et 4 avec une CVP modérée (entre 3 et 4 log).

La comparaison des valeurs de charges virale plasmatique des différents échantillons de DBS a été réalisée en calculant leur différence de log avec le plasma. Globalement quel que soit le volume de sang déposé, 12 échantillons ont présenté une discordance entre plasma et DBS avec une différence de log comprise entre 0,51 et 1. Parmi ces 12 échantillons, 6 ne sont discordants que pour un seul volume de DBS dont 3 pour les DBS 150, 4 sont discordants pour plus de 2 volumes et 2 sont discordants pour plus de 3 volumes de sang déposé sur carte.

Les différences de log entre plasma et les différents volumes sur DBS a montré que pour chacun des volumes de sang déposé sur les cartes, la majorité des échantillons (entre 25 et 27) présente des résultats concordants avec une différence de log en valeur absolue inférieure à 0,5 c'est-à-dire non significative. Le nombre d'échantillons discordants ($\Delta\log > 0,5$ en valeur absolue) ne varie pas beaucoup (entre 4 et 6) selon le volume de sang déposé :

- ✓ 6 échantillons sur 31 (19,35%) pour la valeur du $\Delta\log$ entre le plasma et DBS_50
- ✓ 5 échantillons sur 31 (16,13%) pour la valeur du $\Delta\log$ entre le plasma et DBS_75
- ✓ 4 échantillons sur 31 (12,9%) pour la valeur du $\Delta\log$ entre le plasma et DBS_100
- ✓ 6 échantillons sur 31 (19,35%) pour la valeur du $\Delta\log$ entre le plasma et DBS_150.

L'analyse des discordances a montré qu'elles concernaient essentiellement les échantillons dont les valeurs ont été supérieures à 4 log. Seul 1 échantillon de charge virale plasmatique en dessous de 4 log (670 copies/ml) a présenté une discordance; celle-ci est observée uniquement pour un dépôt de 150 μ l de sang sur carte. Pour tous les 12 échantillons correspondant à 21 cas de discordances vis-à-vis du plasma, les valeurs des CVP ont été supérieures à celles obtenues avec les différents volumes de DBS. Les courbes de concordances avec les moyennes des différences sont à peu près similaires quel que soit le volume considéré avec -0,24 pour le DBS_50, -0,305 pour DBS_75, -0,254 pour DBS_100 et -0,268 pour DBS_150.

La Comparaison des valeurs de charge virale obtenues sur DBS a montré que quel que soit le volume de sang déposé considéré, 5 échantillons ont présenté une discordance entre les différents volumes de DBS avec une différence de log en valeur absolue comprise entre 0,69 et 0,76. Parmi ces 5 échantillons, 1 seul présentait une discordance pour 2 volumes (DBS_50/75

et DBS_75/150) soit un total de 6 discordances. Le Bland-Altman DBS 75 vs 150 montre un échantillon hors de l'intervalle de confiance, en dessus de la limite supérieure avec un biais de 0,0369 [- 0,069 à 0,135 Aucune discordance n'a été noté pour les volumes DBS 50 vs 100, DBS 75 vs 100 et DBS 100 vs 150. La comparaison des moyennes des différences a montré une différence extrêmement faible entre les volumes mais aussi que le DBS_100 (-0.0139) est celui qui est le plus proche du DBS_50.

Ces résultats montrent que le papier buvard peut être utilisé comme un moyen alternatif pour le suivi virologique des PVVIH dans des sites n'ayant pas de micropipettes car le cercle pourrait servir de moyen d'appréciation du volume à déposer à condition que 1 le cercle de 12mm de diamètre circonscrit pour cet effet soit bien saturé.

Cependant, il serait nécessaire de poursuivre cette étude pour :

- ✓ d'une part évaluer les résultats sur le terrain en confectionnant les spots au site de prise en charge clinique
- ✓ d'autre part d'évaluer la possibilité d'utiliser aussi des spots de sang capillaire pour rendre l'outil encore plus accessible.

Références bibliographiques

1. Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. MMWR Morbidity and mortality weekly report. 1981;30(21):250-2. Epub 1981/06/05.
2. Epidemiologic Notes and Reports Persistent, Generalized Lymphadenopathy among Homosexual Males. MMWR Morbidity and mortality weekly report. 1982;31(19):249-51 Epub 1982/05/21.
3. RAPPORT ONUSIDA SUR L'EPIDEMIE MONDIALE DE SIDA. 2012.
4. RAPPORT DE SITUATION SUR LA RIPOSTE NATIONALE A L'ÉPIDÉMIE DE VIH/SIDA SÉNÉGAL : 2010-2011. In: SIDA CNdLcl, editor. 2012.
5. WHO Guidelines for PTMTCT & Breastfeeding2013.
6. Arredondo M, Garrido C, Parkin N, Zahonero N, Bertagnolio S, Soriano V, et al. Comparison of HIV-1 RNA measurements obtained by using plasma and dried blood spots in the automated abbott real-time viral load assay. Journal of clinical microbiology. 2012;50(3):569-72. Epub 2011/12/16.
7. Baggaley RF, Boily MC, White RG, Alary M. Risk of HIV-1 transmission for parenteral exposure and blood transfusion: a systematic review and meta-analysis. AIDS. 2006;20(6):805-12. Epub 2006/03/22.
8. Barin F, M'Boup S, Denis F, Kanki P, Allan JS, Lee TH, et al. Serological evidence for virus related to simian T-lymphotropic retrovirus III in residents of west Africa. Lancet. 1985;2(8469-70):1387-9. Epub 1985/12/21.
9. BARRE-SINOUESSI F. Les VIH, rappel virologique Impact Médecin-Guide. SIDA1997. p. 12-20p.
10. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science. 1983;220(4599):868-71. Epub 1983/05/20.
11. Beyrer C, Baral SD, van Griensven F, Goodreau SM, Chariyalertsak S, Wirtz AL, et al. Global epidemiology of HIV infection in men who have sex with men. Lancet. 2012;380(9839):367-77. Epub 2012/07/24.
12. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. Journal of clinical microbiology. 1990;28(3):495-503. Epub 1990/03/01.

13. **Bowers M.** Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. BETA bulletin of experimental treatments for AIDS : a publication of the San Francisco AIDS foundation. 1996;19-22. Epub 1996/06/01.
14. **Broder S.** Twenty-five years of translational medicine in antiretroviral therapy: promises to keep. Science translational medicine. 2010;2(39):39ps3. Epub 2010/07/09.
15. **Brossard Y, Aubin JT, Mandelbrot L, Bignozzi C, Brand D, Chaput A, et al.** Frequency of early in utero HIV-1 infection: a blind DNA polymerase chain reaction study on 100 fetal thymuses. AIDS. 1995;9(4):359-66. Epub 1995/04/01.
16. **Brun-Vezinet F., Wainberg M.,** HIV : Structure, multiplication et physiopathologie. In: ESTEM, editor. Traité de virologie médicale2003. p. 319-27.
17. **Burgard M, Jasseron C, Matheron S, Damond F, Hamrene K, Blanche S, et al.** Mother-to-child transmission of HIV-2 infection from 1986 to 2007 in the ANRS French Perinatal Cohort EPF-CO1. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2010;51(7):833-43. Epub 2010/09/02.
18. **BURGARD M., MAYAUX M.J., BLANCHE S., et al.** . The use of viral culture and p24 antigen testing to diagnose human immunodeficiency virus infection in neonates. N Engl J Med. 1992;327:1192-7.
19. **C. Touré-Kane HD-N, S. Diallo, C. Thiombiano, N. Leye, O. Ndiaye, K. Kébé, M. Thiam, A.A.M. Diaoura, S. Mboup.** Performance of Nuclisens HIV-1 EasyQ Version 2.0 compared with HIV-1 EasyQ Version 1.2 in Sénégal. ICASA 20112011.
20. **CASSUTO J. P., PESCE A., QUARANTA J. F. .** Chap 6 : DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE L'INFECTION PAR LE VIH. In: MASSON, editor. Sida et infection par le VIH. 3^{ème} ed. p. 66p.
21. **Chapman TM, Plosker GL, Perry CM.** Fosamprenavir: a review of its use in the management of antiretroviral therapy-naïve patients with HIV infection. Drugs. 2004;64(18):2101-24. Epub 2004/09/03.
22. **Charneau P, Borman AM, Quillent C, Guetard D, Chamaret S, Cohen J, et al.** Isolation and envelope sequence of a highly divergent HIV-1 isolate: definition of a new HIV-1 group. Virology. 1994;205(1):247-53. Epub 1994/11/15.
23. **Checkley MA, Luttge BG, Freed EO.** HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. Journal of molecular biology. 2011;410(4):582-608. Epub 2011/07/19.

24. Chermann JC, Barre-Sinoussi F, Dauguet C, Brun-Vezinet F, Rouzioux C, Rozenbaum W, et al. Isolation of a new retrovirus in a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome. *Antibiotics and chemotherapy*. 1983;32:48-53. Epub 1983/01/01.
25. Choisy M, Woelk CH, Guegan JF, Robertson DL. Comparative study of adaptive molecular evolution in different human immunodeficiency virus groups and subtypes. *Journal of virology*. 2004;78(4):1962-70. Epub 2004/01/30.
26. Chukkapalli V, Ono A. Molecular determinants that regulate plasma membrane association of HIV-1 Gag. *Journal of molecular biology*. 2011;410(4):512-24. Epub 2011/07/19.
27. Clavel F, Hance AJ. HIV drug resistance. *The New England journal of medicine*. 2004;350(10):1023-35. Epub 2004/03/05.
28. CLAVEL F., GUETARD D., . Isolation of new human retrovirus from west Africa patients with AIDS. *Science*,. 1986 Jul.;18 (233 (4761)): 343- 6.
29. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, Kumarasamy N, et al. Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. *The New England journal of medicine*. 2011;365(6):493-505. Epub 2011/07/20.
30. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*. 1991;350(6313):91-2. Epub 1991/03/07.
31. Connor EM, Sperling RS, Gelber R, Kiselev P, Scott G, O'Sullivan MJ, et al. Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *The New England journal of medicine*. 1994;331(18):1173-80. Epub 1994/11/03.
32. DARELL WARD. Comprendre le VIH/SIDA : 4^{ème} chap : Infection par le VIH et progression de la maladie. Nouveaux Horizons ed2002. p. 65p.
33. DARELL WARD. 2^{ème} Chap : dépistage du VIH. Comprendre le VIH/SIDA: Nouveaux Horizons; 2002. p. 24p.
34. David S, Sachithanandham J, Jerobin J, Parasuram S, Kannangai R. Comparison of HIV-1 RNA level estimated with plasma and DBS samples: a pilot study from India (South). *Indian journal of medical microbiology*. 2012;30(4):403-6. Epub 2012/11/28.
35. de Mendoza C, Koppelman M, Montes B, Ferre V, Soriano V, Cuypers H, et al. Multicenter evaluation of the NucliSens EasyQ HIV-1 v1.1 assay for the quantitative detection of HIV-1 RNA in plasma. *Journal of virological methods*. 2005;127(1):54-9. Epub 2005/05/17.

36. **DILLON B., HECHT F.M., SWANSON M.** . Primary HIV infections associated with oral transmission. 7th conference on retroviruses and opportunists infections; San Francisco2000; Abstract 473.
37. **Do T, Duncan J, Butcher A, Liegler T.** Comparative frequencies of HIV low-level viremia between real-time viral load assays at clinically relevant thresholds. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology. 2011;52 Suppl 1:S83-9. Epub 2011/10/15.
38. **Eholié S. P., Girard P-M., Bissagnéné E., Dariosecq J-M., Inwoley A., Sow P. S., Taburet A-M., Traoré H. A.** Memento Thérapeutique du VIH/SIDA en Afrique. 2^{ème} ed2009. p. 8p.
39. **FATTORUSSO V., RITTER O.** . Vademecum Clinique “Du diagnostic au traitement”. 17^{ème} ed2004. p. 442p
40. **Fiorentini S, Marini E, Caracciolo S, Caruso A.** Functions of the HIV-1 matrix protein p17. The new microbiologica. 2006;29(1):1-10. Epub 2006/04/13.
41. **Gao F, Yue L, Robertson DL, Hill SC, Hui H, Biggar RJ, et al.** Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. Journal of virology. 1994;68(11):7433-47. Epub 1994/11/01.
42. **Garrick MD, Dembure P, Guthrie R.** Sickle-cell anemia and other hemoglobinopathies. Procedures and strategy for screening employing spots of blood on filter paper as specimens. The New England journal of medicine. 1973;288(24):1265-8. Epub 1973/06/14.
43. **Garrido C, Zahonero N, Corral A, Arredondo M, Soriano V, de Mendoza C.** Correlation between human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA measurements obtained with dried blood spots and those obtained with plasma by use of Nuclisens EasyQ HIV-1 and Abbott RealTime HIV load tests. Journal of clinical microbiology. 2009;47(4):1031-6. Epub 2009/02/06.
44. **Giagulli C, Magiera AK, Bugatti A, Caccuri F, Marsico S, Rusnati M, et al.** HIV-1 matrix protein p17 binds to the IL-8 receptor CXCR1 and shows IL-8-like chemokine activity on monocytes through Rho/ROCK activation. Blood. 2012;119(10):2274-83. Epub 2012/01/21.
45. **GOEDERT J. J., DULIEGE AM., AMOS CI., et al.** . High risk of infection with HIV-1 for first-born twins. The Lancet infectious diseases. 1991;338:1471-5.
46. **Gorry PR, Ancuta P.** Coreceptors and HIV-1 pathogenesis. Current HIV/AIDS reports. 2011;8(1):45-53. Epub 2010/12/29.

47. **Gougeon M. L., Montagnier L.** Apoptose in AIDS (published erratum in Science, 1993;260:1709). In: Science, editor.1993. p. 1269-70.
48. **Grenier B, Dubreuil M, Journois D.** [Comparison of two measurement methods: the Bland and Altman assessment]. Annales francaises d'anesthesie et de reanimation. 2000;19(2):128-35. Epub 2000/03/24. Comparaison de deux methodes de mesure d'une meme grandeur: methode de Bland et Altman.
49. **Grewé B, Überla K.** The human immunodeficiency virus type 1 Rev protein: menage à trois during the early phase of the lentiviral replication cycle. The Journal of general virology. 2010;91(Pt 8):1893-7. Epub 2010/06/12.
50. **Guthrie R, Susi A.** A Simple Phenylalanine Method for Detecting Phenylketonuria in Large Populations of Newborn Infants. Pediatrics. 1963;32:338-43. Epub 1963/09/01.
51. **Guyader M, Emerman M, Sonigo P, Clavel F, Montagnier L, Alizon M.** Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. Nature. 1987;326(6114):662-9. Epub 1987/04/16.
52. **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. J Acquir Immune Defic Syndr. 1992;5(5):505-12. Epub 1992/01/01.
53. **HALPERIN D.T., SHIBOSKI S.C., PALEFSKI J.M., PADIAN N.** . High level of HIV1 intercourse infection from and intercourse; a neglected risk factor in heterosexual AIDS prevention. XIV International AIDS conference; Barcelona2002. p. ThPe C7439.
54. **Hannon WH, Lewis DS, Jones WK, Powell MK.** A quality assurance program for human immunodeficiency virus seropositivity screening of dried-blood spot specimens. Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America. 1989;10(1):8-13. Epub 1989/01/01.
55. **Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S.** Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. AIDS. 2011;25(5):679-89. Epub 2011/02/08.
56. **Jani IV, Sabatier J, Vubil A, Subbarao S, Bila D, de Sousa A, et al.** Evaluation of a high-throughput diagnostic system for detection of HIV-1 in dried blood spot samples from infants in Mozambique. Journal of clinical microbiology. 2012;50(4):1458-60. Epub 2012/01/27.
57. **Johannessen A, Garrido C, Zahonero N, Sandvik L, Naman E, Kivuyo SL, et al.** Dried blood spots perform well in viral load monitoring of patients who receive antiretroviral

treatment in rural Tanzania. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2009;49(6):976-81. Epub 2009/08/12.

58. Kahn JO, Walker BD. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. The New England journal of medicine. 1998;339(1):33-9. Epub 1998/07/02.

59. KAHN W.A., RICHARDSON C., MANDELIA S., BARTON S.E. Safer sex in HIV infected patients in london : practices and risks sex transm infect. 2001;77:394.

60. Kane CT, Ndiaye HD, Diallo S, Ndiaye I, Wade AS, Diaw PA, et al. 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):291-5. Epub 2008/02/05.

61. Kanyalkar M, Srivastava S, Saran A, Coutinho E. Conformational study of fragments of envelope proteins (gp120: 254-274 and gp41: 519-541) of HIV-1 by NMR and MD simulations. Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society. 2004;10(6):363-80. Epub 2004/06/25.

62. Kapadia F, Vlahov D, Donahoe RM, Friedland G. The role of substance abuse in HIV disease progression: reconciling differences from laboratory and epidemiologic investigations. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2005;41(7):1027-34. Epub 2005/09/06.

63. Kobayashi M, Yoshinaga T, Seki T, Wakasa-Morimoto C, Brown KW, Ferris R, et al. In Vitro antiretroviral properties of S/GSK1349572, a next-generation HIV integrase inhibitor. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2011;55(2):813-21. Epub 2010/12/01.

64. LAPOINTE N., MICHAUD J., PEKOVID D., et coll. . L'infection au VIH de la Mère à l'Enfant. Collection dirigée par le Professeur GENTILINI MARE. Marketing/Ellipses ed. Paris1995. p. 95p.

65. LAPORTE A. SIDA et Infection par VIH : définition. chap.I Tiré de SIDA et Infection par VIH par MONTAIGNIER L., ROZENBAUM W, GLUCKMAN J. C Médecine – Sciences Flammarion, Paris; 1983. p. 593p.

66. Le Rouzic E, Benichou S. The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. Retrovirology. 2005;2:11. Epub 2005/02/24.

67. Leelawiwat W, Young NL, Chaowanachan T, Ou CY, Culnane M, Vanprapa N, et al. Dried blood spots for the diagnosis and quantitation of HIV-1: stability studies and evaluation of sensitivity and specificity for the diagnosis of infant HIV-1 infection in Thailand. Journal of virological methods. 2009;155(2):109-17. Epub 2008/10/28.

68. **Leroy V, Newell ML, Dabis F, Peckham C, Van de Perre P, Butlyrs M, et al.** International multicentre pooled analysis of late postnatal mother-to-child transmission of HIV-1 infection. Ghent International Working Group on Mother-to-Child Transmission of HIV. Lancet. 1998;352(9128):597-600. Epub 1998/09/24.
69. **Leynaert B, Downs AM, de Vincenzi I.** Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus: variability of infectivity throughout the course of infection. European Study Group on Heterosexual Transmission of HIV. American journal of epidemiology. 1998;148(1):88-96. Epub 1998/07/15.
70. **Li L, Chen L, Yang S, Li T, Li J, Liu Y, et al.** Recombination form and epidemiology of HIV-1 unique recombinant strains identified in Yunnan, China. PloS one. 2012;7(10):e46777. Epub 2012/10/12.
71. **Li ZY, Zhan P, Liu XY.** [Progress in the study of HIV-1 Vif and related inhibitors]. Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica. 2010;45(6):684-93. Epub 2010/10/14.
72. **Liberatore D, Avila MM, Calarota S, Libonatti O, Martinez Peralta L.** Diagnosis of perinatally acquired HIV-1 infection using an IgA ELISA test. Pediatric AIDS and HIV infection. 1996;7(3):164-7. Epub 1996/06/01.
73. **Liu B, Li Z.** Endoplasmic reticulum HSP90b1 (gp96, grp94) optimizes B-cell function via chaperoning integrin and TLR but not immunoglobulin. Blood. 2008;112(4):1223-30. Epub 2008/05/30.
74. **Mandala S, Westrop SJ, Beck EJ, Nelson M, Gazzard BG, Imami N.** Are long-term non-progressors very slow progressors? Insights from the Chelsea and Westminster HIV cohort, 1988-2010. PloS one. 2012;7(2):e29844. Epub 2012/03/01.
75. **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):106-9. Epub 2011/12/27.
76. **Mei JV, Alexander JR, Adam BW, Hannon WH.** Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. The Journal of nutrition. 2001;131(5):1631S-6S. Epub 2001/05/08.
77. **Menu E, Mbopi-Keou FX, Lagaye S, Pissard S, Mauclere P, Scarlatti G, et al.** Selection of maternal human immunodeficiency virus type 1 variants in human placenta.

European Network for In Utero Transmission of HIV-1. The Journal of infectious diseases. 1999;179(1):44-51. Epub 1998/12/08.

78. **Modrow S, Hoflacher B, Gurtler L, Deinhardt F, Wolf H.** Carrier bound synthetic oligopeptides in ELISA test systems for distinction between HIV-1 and HIV-2 infection. J Acquir Immune Defic Syndr. 1989;2(2):141-8. Epub 1989/01/01.

79. **Monleau M, Montavon C, Laurent C, Segondy M, Montes B, Delaporte E, et al.** Evaluation of different RNA extraction methods and storage conditions of dried plasma or blood spots for human immunodeficiency virus type 1 RNA quantification and PCR amplification for drug resistance testing. Journal of clinical microbiology. 2009;47(4):1107-18. Epub 2009/02/06.

80. **Montavon C, Toure-Kane C, Liegeois F, Mpoudi E, Bourgeois A, Vergne L, et al.** Most env and gag subtype A HIV-1 viruses circulating in West and West Central Africa are similar to the prototype AG recombinant virus IBNG. J Acquir Immune Defic Syndr. 2000;23(5):363-74. Epub 2000/06/24.

81. **Mylonakis E, Paliou M, Rich JD.** Plasma viral load testing in the management of HIV infection. American family physician. 2001;63(3):483-90, 95-6. Epub 2001/03/29.

82. **Nduati R, John G, Mbori-Ngacha D, Richardson B, Overbaugh J, Mwatha A, et al.** Effect of breastfeeding and formula feeding on transmission of HIV-1: a randomized clinical trial. JAMA : the journal of the American Medical Association. 2000;283(9):1167-74. Epub 2000/03/07.

83. **Nehar S, Mishra M, Heese K.** Identification and characterisation of the novel amyloid-beta peptide-induced protein p17. FEBS letters. 2009;583(19):3247-53. Epub 2009/09/17.

84. **Nielsen MH, Pedersen FS, Kjems J.** Molecular strategies to inhibit HIV-1 replication. Retrovirology. 2005;2:10. Epub 2005/02/18.

85. **NOUVO G.J., BECKER J., BURK M.W., et al.** In situ detection of PCR-amplified HIV-1 nucleic acids in lymph nodes and peripheral blood in patients with asymptomatic HIV-1 infection and advanced-stage AIDS. J Acquir Immuno Defic Syndr. 1994;7:916-23.

86. **Nyamweya S, Hegedus A, Jaye A, Rowland-Jones S, Flanagan KL, Macallan DC.** Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis. Reviews in medical virology. 2013;23(4):221-40. Epub 2013/02/28.

87. **OMS.** Traitement Antirétroviral de l'infection à VIH SIDA chez l'adulte et l'adolescent: recommandations pour une approche de santé publique2010.

88. **OMS.** O. Améliorer d'urgence l'accès aux traitements antirétroviraux dans les pays à ressources limitées : recommandations techniques et opérationnelles en vue de traiter trois millions de personnes d'ici 2005. Rapport d'une réunion internationalede consensus de l'OMS et de l'ONUSIDA sur les recommandations techniques et opérationnelles relatives à une généralisation rapide de l'accès à la thérapie antirétrovirale dans les pays à ressources limitées, 18-21 novembre 2003, Lusaka (Zambie) Organisation mondiale, 2003.
89. **Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS.** New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *The New England journal of medicine.* 1993;328(5):327-35. Epub 1993/02/04.
90. **Parent LJ, Gudleski N.** Beyond plasma membrane targeting: role of the MA domain of Gag in retroviral genome encapsidation. *Journal of molecular biology.* 2011;410(4):553-64. Epub 2011/07/19.
91. **Paul W. E.** Can the immune response control HIV infection? *Cell biochemistry and biophysics.* 1995;82:177-82.
92. **Peeters M, Delaporte E.** [Genetic diversity of HIV infection worldwide and its consequences]. *Medecine tropicale : revue du Corps de sante colonial.* 1999;59(4 Pt 2):449-55. Epub 2000/07/21. Diversité génétique de l'infection à VIH dans le Monde et ses conséquences.
93. **PILLONEL J., LAPERCHE S., SAURA C., DESENCLOS JC., COUROUCE AM., AND THE TRANSFUSION-TRANSMISSIBLE AGENTS WORKING GROUP OF THE FRENCH SOCIETY OF BLOOD TRANSFUSSION.** . Trends in residual risk of transfusion-transmitted viral infection in France between 1992 and 2000. *Transfusion.* 2002;42:980-8.
94. **Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemee V, et al.** A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature medicine.* 2009;15(8):871-2. Epub 2009/08/04.
95. **Pozniak AL, Gallant JE, DeJesus E, Arribas JR, Gazzard B, Campo RE, et al.** Tenofovir disoproxil fumarate, emtricitabine, and efavirenz versus fixed-dose zidovudine/lamivudine and efavirenz in antiretroviral-naïve patients: virologic, immunologic, and morphologic changes--a 96-week analysis. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006;43(5):535-40. Epub 2006/10/24.
96. **Pulido F, Estrada V, Baril JG, Logue K, Schewe K, Plettenberg A, et al.** Long-term efficacy and safety of fosamprenavir plus ritonavir versus lopinavir/ritonavir in combination

with abacavir/lamivudine over 144 weeks. *HIV clinical trials.* 2009;10(2):76-87. Epub 2009/06/03.

97. **QUARANTA J.F., TICCHIONI M., VIVINUS-NEBOT M., et al.** 3^{ème} Partie : Le bilan immunohématologique de surveillance. Feuillets de Biologie. Infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)1991. p. 17-23.

98. **Ragupathy V, Zhao J, Wood O, Tang S, Lee S, Nyambi P, et al.** Identification of new, emerging HIV-1 unique recombinant forms and drug resistant viruses circulating in Cameroon. *Virology journal.* 2011;8:185. Epub 2011/04/26.

99. **Rothe M, Israel N, Barre-Sinoussi F.** Mécanismes de réPLICATION virale des VIH. Médecine et thérapeutique1996. p. 12-8.

100. **Rottinghaus E, Bile E, Modukanele M, Maruping M, Mine M, Nkengasong J, et al.** 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. *Journal of clinical microbiology.* 2013;51(1):55-60. Epub 2012/10/19.

101. **Rottinghaus EK, Ugbena R, Diallo K, Bassey O, Azeez A, Devos J, et al.** 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):1187-95. Epub 2012/03/14.

102. **Rouzioux C, Costagliola D, Burgard M, Blanche S, Mayaux MJ, Griscelli C, et al.** Estimated timing of mother-to-child human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmission by use of a Markov model. The HIV Infection in Newborns French Collaborative Study Group. *American journal of epidemiology.* 1995;142(12):1330-7. Epub 1995/12/15.

103. **Rozenbaum W.** Indications thérapeutiques des antirétroviraux. Les dossiers du praticien : Guide SIDA1997. p. 107-18.

104. **Ruiz A, Guatelli JC, Stephens EB.** The Vpu protein: new concepts in virus release and CD4 down-modulation. *Current HIV research.* 2010;8(3):240-52. Epub 2010/03/06.

105. **Rulli SJ, Jr., Muriaux D, Nagashima K, Mirro J, Oshima M, Baumann JG, et al.** Mutant murine leukemia virus Gag proteins lacking proline at the N-terminus of the capsid domain block infectivity in virions containing wild-type Gag. *Virology.* 2006;347(2):364-71. Epub 2006/01/24.

106. **Saada M, Le Chenadec J, Berrebi A, Bongain A, Delfraissy JF, Mayaux MJ, et al.** Pregnancy and progression to AIDS: results of the French prospective cohorts. SEROGEST and SEROCO Study Groups. *AIDS*. 2000;14(15):2355-60. Epub 2000/11/23.
107. **Scavalli CP, Mandelbrot L, Berrebi A, Batallan A, Cravello L, Pannier E, et al.** Twin pregnancy as a risk factor for mother-to-child transmission of HIV-1: trends over 20 years. *AIDS*. 2007;21(8):993-1002. Epub 2007/04/26.
108. **Simon F, Mauclere P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Muller-Trutwin MC, Saragosti S, et al.** Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nature medicine*. 1998;4(9):1032-7. Epub 1998/09/12.
109. **Solbak SM, Reksten TR, Hahn F, Wray V, Henklein P, Halskau O, et al.** HIV-1 p6 - a structured to flexible multifunctional membrane-interacting protein. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1828(2):816-23. Epub 2012/11/24.
110. **Sterjovski J, Churchill MJ, Wesselingh SL, Gorry PR.** HIV-1 entry inhibitors: classes, applications and factors affecting potency. *Current HIV research*. 2006;4(4):387-400. Epub 2006/11/01.
111. **Stettner MR, Nance JA, Wright CA, Kinoshita Y, Kim WK, Morgello S, et al.** SMAD proteins of oligodendroglial cells regulate transcription of JC virus early and late genes coordinately with the Tat protein of human immunodeficiency virus type 1. *The Journal of general virology*. 2009;90(Pt 8):2005-14. Epub 2009/05/08.
112. **Stevens W, Wiggill T, Horsfield P, Coetzee L, Scott LE.** Evaluation of the NucliSens EasyQ assay in HIV-1-infected individuals in South Africa. *Journal of virological methods*. 2005;124(1-2):105-10. Epub 2005/01/25.
113. **Stevenson M.** **HIV-1 pathogenesis.** *Nature medicine*. 2003;9(7):853-60. Epub 2003/07/02.
114. **Taiwo B, Murphy RL, Katlama C.** Novel antiretroviral combinations in treatment-experienced patients with HIV infection: rationale and results. *Drugs*. 2010;70(13):1629-42. Epub 2010/08/25.
115. **THIRY L., SPRECHER-GOLDBERGER S., JONCKHERT T., et al.** Isolation of AIDS virus from cell-free breast milk of three healthy virus carriers. *The Lancet infectious diseases*. 1989;891-2.
116. **Thomas JA, Gorelick RJ.** Nucleocapsid protein function in early infection processes. *Virus research*. 2008;134(1-2):39-63. Epub 2008/02/19.

117. **Toure-Kane C, Montavon C, Faye MA, Gueye PM, Sow PS, Ndoye I, et al.** Identification of all HIV type 1 group M subtypes in Senegal, a country with low and stable seroprevalence. AIDS research and human retroviruses. 2000;16(6):603-9. Epub 2000/04/25.
118. **Tyagi S, Bratu DP, Kramer FR.** Multicolor molecular beacons for allele discrimination. Nature biotechnology. 1998;16(1):49-53. Epub 1998/02/03.
119. **Tyagi S, Kramer FR.** Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. Nature biotechnology. 1996;14(3):303-8. Epub 1996/03/01.
120. **van Deursen P, Oosterlaken T, Andre P, Verhoeven A, Bertens L, Trabaud MA, et al.** Measuring human immunodeficiency virus type 1 RNA loads in dried blood spot specimens using NucliSENS EasyQ HIV-1 v2.0. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology. 2010;47(2):120-5. Epub 2009/12/19.
121. **Wang B, Lu X, Lu Y.** [Detection of proviral gene of human immunodeficiency virus type 1 from dried blood spots]. Zhonghua shi yan he lin chuang bing du xue za zhi = Zhonghua shiyan he linchuang bingduxue zazhi = Chinese journal of experimental and clinical virology. 1998;12(3):281-4. Epub 2003/01/16.
122. **Weusten JJ, Carpay WM, Oosterlaken TA, van Zuijlen MC, van de Wiel PA.** Principles of quantitation of viral loads using nucleic acid sequence-based amplification in combination with homogeneous detection using molecular beacons. Nucleic acids research. 2002;30(6):e26. Epub 2002/03/09.
123. **Whittall T, Peters B, Rahman D, Kingsley CI, Vaughan R, Lehner T.** Immunogenic and tolerogenic signatures in human immunodeficiency virus (HIV)-infected controllers compared with progressors and a conversion strategy of virus control. Clinical and experimental immunology. 2011;166(2):208-17. Epub 2011/10/12.
124. **Xu S, Song A, Nie J, Li X, Meng S, Zhang C, et al.** Comparison between the automated Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 test version 2.0 assay and its version 1 and Nuclisens HIV-1 EasyQ version 2.0 assays when measuring diverse HIV-1 genotypes in China. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology. 2012;53(1):33-7. Epub 2011/11/05.
125. **Xu S, Song A, Nie J, Li X, Wang Y.** Performance of Nuclisens HIV-1 EasyQ Version 2.0 compared with six commercially available quantitative nucleic acid assays for detection of HIV-1 in China. Molecular diagnosis & therapy. 2010;14(5):305-16. Epub 2010/11/09.

126. **Yao J, Liu Z, Ko LS, Pan G, Jiang Y.** Quantitative detection of HIV-1 RNA using NucliSens EasyQ HIV-1 assay. *Journal of virological methods*. 2005;129(1):40-6. Epub 2005/06/18.

127. **Zaunders J, van Bockel D.** Innate and Adaptive Immunity in Long-Term Non-Progression in HIV Disease. *Frontiers in immunology*. 2013;4:95. Epub 2013/05/01.

Annexe 1

Echantillons	100µl Plasma	2*50µl DBS	2*75µl DBS	2*100µl DBS	2*150µl DBS	Log 10 (100µl Plasma)	Log 10 (2*50µl DBS)	Log 10 (2*75µl DBS)	Log 10 (2*100µl DBS)	Log 10 (2*150µl DBS)	DLOG PL-50	DLOG PL-75	DLOG PL-100	DLOG PL-150	DLOG 50-75	DLOG 50-100	DLOG 50-150	DLOG 75-100	DLOG 75-150	DLOG 100-150
M. D	670	240	290	250	200	2,83	2,38	2,46	2,40	2,30	0,45	0,36	0,43	0,53	- 0,08	- 0,02	0,08	0,06	0,16	0,10
D. D	850	1100	810	390	420	2,93	3,04	2,91	2,59	2,62	- 0,11	0,02	0,34	0,31	0,13	0,45	0,42	0,32	0,29	- 0,03
10777 HALD	2200	980	940	970	1200	3,34	2,99	2,97	2,99	3,08	0,35	0,37	0,36	0,26	0,02	0,00	- 0,09	- 0,01	0,11	- 0,09
10738 HALD	2900	2100	5700	2700	2000	3,46	3,32	3,76	3,43	3,30	0,14	- 0,29	0,03	0,16	- 0,43	- 0,11	0,02	0,32	0,45	0,13
AM	4800	2700	2300	4400	1800	3,68	3,43	3,36	3,64	3,26	0,25	0,32	0,04	0,43	0,07	- 0,21	0,18	- 0,28	0,11	0,39
N. B	9400	15000	3900	9700	13000	3,97	4,18	3,59	3,99	4,11	- 0,20	0,38	- 0,01	- 0,14	0,59	0,19	0,06	- 0,40	0,52	- 0,13
10650 HALD	19000	11000	1900	5000	4300	4,28	4,04	3,28	3,70	3,63	0,24	1,00	0,58	0,65	0,76	0,34	0,41	- 0,42	0,35	0,07
11027 HALD	19000	8200	9100	15000	9300	4,28	3,91	3,96	4,18	3,97	0,36	0,32	0,10	0,31	- 0,05	- 0,26	- 0,05	- 0,22	0,01	0,21
10647 HALD	23000	5500	4800	9000	8400	4,36	3,74	3,68	3,95	3,9243	0,62	0,68	0,41	0,44	0,06	- 0,21	- 0,18	- 0,27	0,24	0,03
10802 HALD	25000	9100	4500	10000	22000	4,40	3,96	3,65	4,00	4,34	0,44	0,74	0,40	0,06	0,31	- 0,04	- 0,38	- 0,35	0,69	- 0,34
10920 HALD	26000	28000	20000	18000	15000	4,41	4,45	4,30	4,26	4,18	- 0,03	0,11	0,16	0,24	0,15	0,19	0,27	0,05	0,12	0,08
11001 HALD	28000	10000	10000	8600	4500	4,45	4,00	4,00	3,93	3,65	0,45	0,45	0,51	0,79	-	0,07	0,35	0,07	0,35	0,28
M. G	55000	15000	18000	13000	23000	4,74	4,18	4,26	4,11	4,36	0,56	0,49	0,63	0,38	- 0,08	0,06	- 0,19	0,14	0,11	- 0,25
10994 HALD	61000	43000	100000	110000	82000	4,79	4,63	5,00	5,04	4,91	0,15	- 0,21	- 0,26	- 0,13	- 0,37	- 0,41	- 0,28	- 0,04	0,09	0,13
M. Lu	88000	20000	20000	17000	10000	4,94	4,30	4,30	4,23	4,00	0,64	0,64	0,71	0,94	-	0,07	0,30	0,07	0,30	0,23
RF-78	90000	110000	46000	42000	96000	4,95	5,04	4,66	4,62	4,98	- 0,09	0,29	0,33	- 0,03	0,38	0,42	0,06	0,04	0,32	- 0,36
AKD	98000	39000	87000	74000	130000	4,99	4,59	4,94	4,87	5,11	0,40	0,05	0,12	- 0,12	- 0,35	- 0,28	- 0,52	0,07	0,17	- 0,24
A. T	110000	62000	71000	55000	90000	5,04	4,79	4,85	4,74	4,95	0,25	0,19	0,30	0,09	- 0,06	0,05	- 0,16	0,11	0,10	- 0,21
M. Di	120000	120000	110000	100000	180000	5,08	5,08	5,04	5,00	5,26	-	0,04	0,08	- 0,18	0,04	0,08	- 0,18	0,04	0,21	- 0,26
10649 HALD	160000	61000	100000	130000	98000	5,20	4,79	5,00	5,11	4,99	0,42	0,20	0,09	0,21	- 0,21	- 0,33	- 0,21	- 0,11	0,01	0,12
11057 HALD	220000	55000	120000	140000	85000	5,34	4,74	5,08	5,15	4,93	0,60	0,26	0,20	0,41	- 0,34	- 0,41	- 0,19	- 0,07	0,22	

P. S	250000	69000	95000	120000	48000	5,40	4,84	4,98	5,08	4,68	0,56	0,42	0,32	0,72	- 0,14	- 0,24	0,16	- 0,10	0,30	0,40
Mlo	290000	790000	230000	320000	300000	5,46	5,90	5,36	5,51	5,48	- 0,44	0,10	- 0,04	- 0,01	0,54	0,39	0,42	- 0,14	0,12	0,03
10833 HALD	400000	75000	130000	150000	220000	5,60	4,88	5,11	5,18	5,34	0,73	0,49	0,43	0,26	- 0,24	- 0,30	- 0,47	- 0,06	0,23	- 0,17
10997 HALD	410000	390000	170000	160000	230000	5,61	5,59	5,23	5,20	5,36	0,02	0,38	0,41	0,25	0,36	0,39	0,23	0,03	0,13	- 0,16
A3-617	480 000	190000	93000	210000	170000	5,68	5,28	4,97	5,32	5,23	0,40	0,71	0,36	0,45	0,31	- 0,04	0,05	- 0,35	0,26	0,09
10681 HALD	560000	660000	360000	300000	270000	5,75	5,82	5,56	5,48	5,43	- 0,07	0,19	0,27	0,32	0,26	0,34	0,39	0,08	0,12	0,05
10867 HALD	620000	880000	620000	530000	1300000	5,79	5,94	5,79	5,72	6,11	- 0,15	-	0,07	- 0,32	0,15	0,22	- 0,17	0,07	0,32	- 0,39
10907 HALD	750000	420000	250000	270000	210000	5,88	5,62	5,40	5,43	5,32	0,25	0,48	0,44	0,55	0,23	0,19	0,30	- 0,03	0,08	0,11
10921 HALD	980000	780000	780000	2100000	980000	5,99	5,89	5,89	6,32	5,99	0,10	0,10	- 0,33	-	-	- 0,43	- 0,10	- 0,43	0,10	0,33
JF	2700000	1800000	1800000	1000000	900000	6,43	6,26	6,26	6,00	5,95	0,18	0,18	0,43	0,48	-	0,26	0,30	0,26	0,30	0,05

Les concordances

Les discordances

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.

PERMIS D'IMPRIMER

Vu :

Le Président du jury

Vu :

Le Doyen de.....

Vu et Permis d'imprimer

Pour le Recteur, Président de l'Assemblée d'Université Cheikh Anta Diop de Dakar
et par délégation

Le Doyen

**EVALUATION DES DIFFERENTS VOLUMES DE SANG DEPOSES SUR PAPIER
BUVARD POUR LA QUANTIFICATION DE L'ARN VIRAL DU VIH-1 PAR LA
TECHNOLOGIE NUCLISENS EASYQ HIV-1 V2.0**

RESUME

Dans la plupart des pays à ressources limitées, le suivi virologique des personnes vivant avec le VIH se limite au niveau central. L'utilisation du papier buvard comme support alternatif de prélèvement améliore le suivi des personnes vivant en zone décentralisée. Cependant, l'exigence de déposer 50 μ l par cercle constitue aussi un frein d'où l'intérêt d'évaluer l'impact du volume de sang à déposer sur la valeur de la charge virale mesurée.

L'étude évaluative a porté sur 31 échantillons de patients naïfs de traitement antirétroviral.

Les DBS (papier de type Whatman 903) ont été réalisées avec différents volumes de sang (50, 75, 100 et 150 μ l), séchés pendant 3h puis conservés à -80°C jusqu'à utilisation. 2 spots de 12mm par carte ont été lysés puis extraits par le Nuclisens EasyMAG.

L'amplification/détection s'est faite par l'analyseur Nuclisens EasyQ.

La comparaison des valeurs de charge virale obtenues sur les plasmas et différents DBS (50, 75, 100 et 150) a été réalisée en calculant leur différence de log avec le plasma (référence). Pour tous les 12 échantillons correspondant à 21 cas de discordances vis-à-vis du plasma, les valeurs des charges virales plasmatiques ont été supérieures à celles obtenues avec les différents volumes de DBS. Les courbes de concordance avec les moyennes des différences sont à peu près similaires quel que soit le volume considéré avec -0.24 pour le DBS_50, -0.305 pour DBS_75, -0.254 pour DBS_100 et -0.268 pour DBS_150.

5 échantillons ont présenté une discordance entre les différents volumes de DBS avec une différence de log en valeur absolue comprise entre 0,69 et 0,76. La comparaison des moyennes des différences a montré une différence extrêmement faible entre les volumes mais aussi que le DBS_100 (-0.0139) est celui qui est le plus proche du DBS_50.

Ces résultats montrent que le papier buvard peut être utilisé comme un moyen alternatif pour le suivi virologique des personnes vivant avec le VIH dans des sites n'ayant pas de micropipettes car le cercle pourrait servir de moyen d'appréciation du volume à déposer à condition que le cercle de 12mm de diamètre circonscrit pour cet effet soit bien saturé.

Mots clés : DBS, Charge virale, VIH-1, Nuclisens EasyQ HIV-1 V2.0

M. NJAMPA NKWETCHOUA