

# UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

\*\*\*\*\*

## ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE, DE LA SANTE ET DE L'ENVIRONNEMENT

\*\*\*\*\*



ANNEE 2016

N° 27

### Evaluation de la performance du Point-of-care CD4 : BD FACSPresto™ ; dans le suivi des patients VIH positifs

MEMOIRE DE MASTER IMMUNOLOGIE ET INFECTION

*Présenté et soutenu publiquement*

**Le 07 Janvier 2016**

Par

**Joséphine Khady Badiane**

Née le 03 Mai 1984 à Dakar (Sénégal)

---

#### MEMBRES DU JURY

<b><u>PRESIDENT :</u></b>	M. Alioune	DIEYE	Professeur
<b><u>MEMBRES :</u></b>	M. Tandakha	NDIAYE DIEYE	Professeur
	M. Makhtar	CAMARA	Maître de Conférences Agrégé
	M. Babacar	MBENGUE	Maître-Assistant
<b><u>DIRECTEUR DE MEMOIRE :</u></b>	M. Tandakha	NDIAYE DIEYE	Professeur
<b><u>CO-DIRECTEURS :</u></b>	M. Papa Alassane	DIAW	Pharmacien Biologiste
	M. Djibril	WADE	PhD

# DEDICACES

Au nom d'Allah, Le Tout Puissant, Le Clément et Le Miséricordieux.

Paix et salut à son envoyé le prophète Mohamed, l'incarnation de la sagesse et de la droiture

A toute sa famille et ses compagnons.

Ce travail est dédié à :

Mon père, pour la bonne éducation qu'il nous a donné et pour tout ce qu'il ne cesse de faire pour notre réussite, je t'adore

Ma mère pour tous les sacrifices consentis et le soutien moral, je t'adore

Mon époux, mon bien aimé, pour ton amitié, ton soutien et ta tolérance inestimable, tout l'amour que tu puisse me donner....., je t'aime de tout mon cœur

Mes frères et sœur, ma belle famille

Tous mes camarades de promotion

Tout le personnel de l'unité d'Immunologie et du laboratoire de Bactériologie.

# REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé à l'unité d'immunologie du laboratoire de bactériologie-virologie de l'hôpital Aristide Le Dantec (Dakar, Sénégal).

Nous exprimons toute notre gratitude à toutes les personnes qui ont participé à notre formation et à la réalisation de ce travail ;

Le professeur Souleymane Mboup, chef du laboratoire de bactériologie-virologie

Le professeur Alioune Dieye, responsable du master d'immunologie et infection

Le professeur Tandakha Ndiaye Dieye, responsable de l'unité d'immunologie du laboratoire de bactériologie-virologie

Madame Maguette Dème Sylla Niang, maître de conférences agrégé

Monsieur Makhtar Camara, maître de conférences agrégé

Docteur Babacar Mbengue, maître-assistant en immunologie

Docteur Djibril Wade, unité d'immunologie du laboratoire de bactériologie-virologie, codirecteur du mémoire

Docteur Papa Alassane Diaw, unité d'immunologie du laboratoire de bactériologie-virologie, codirecteur du mémoire

Docteur Moustapha Mbow, unité d'immunologie du laboratoire de bactériologie-virologie

Tous les enseignants du master d'immunologie et infection

Tout le personnel de l'unité d'immunologie et du laboratoire de bactériologie-virologie de l'hôpital Aristide Le Dantec

Tout le personnel du Centre de Traitements Ambulatoires (CTA) et du Centre de Recherche et de Formation Clinique (CRCF)

La coopération Belge (IMT)

La compagnie BD Biosciences

## LISTE DES ABREVIATIONS

**ADN** : acide dexoxyribonucleique

**ARN** : acide Ribonucleique

**ARV**: antirétroviraux

**CD**: cluster of differentiation

**CDC**: center of desease control

**CHUN**: centre hospitalière universitaire nationale

**CMH**: complexe majeur d'histocompatibilité

**CRCF**: Centre de Recherche et de Formation Clinique

**CTA**: Traitements Ambulatoires

**CV**: charge virale

**EDTA**: ethylenediaminetetraacetic acid

**ELISA**: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

**FITC**:\_Fluorescéine isothiocyanate

**FSC**: forward scatter

**HTLV3**: Human T-Lymphotropic Virus type 3

**Ig**: immunoglobulines

**INNTI**: Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse

**INTI**: Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse

**IP**: inhibiteurs de la protéase

**ITS:** infection transmissible sexuellement

**LAV:** Lymphadenopathy Associated Virus

**LOA:** limits of agreement

**OMS:** organization mondiale de la santé

**PE:** phycoérythrine

**PerCP :** Peridinin chlorophyll protein

**PMT:** photomultiplicateurs

**POC:** Point Of Care

**PVVIH:** patient vivant avec le VIH

**SIDA:** syndrome d'inunodéficience acquise

**SSC:** side scatter

**TCR:** T cell receptor

**VIH :** virus de l'immunodéficience humaine

## LISTE DES FIGURES

<b><u>Figure 1</u></b> : Prévalence de l'infection à VIH chez les adultes en 2013 .....	4
<b><u>Figure 2</u></b> : Structure du VIH .....	5
<b><u>Figure 3</u></b> : Génome du VIH-1.....	6
<b><u>Figure 4</u></b> : Cycle de réplication du VIH .....	7
<b><u>Figure 5</u></b> : Evolution typique de l'infection par VIH-1.....	9
<b><u>Figure 6</u></b> : Rôle du récepteur DC-SIGN dans la pathologie du VIH .....	10
<b><u>Figure 7</u></b> : Pathogenèse de l'infection par le VIH.....	11
<b><u>Figure 8</u></b> : Réponse induite par les lymphocytes T CD8.....	13
<b><u>Figure 9</u></b> : Sites d'intervention des ARV dans le Cycle de réplication du VIH.....	14
<b><u>Figure 10</u></b> : FACSCalibur .....	19
<b><u>Figure 11</u></b> : FACSCount.....	20
<b><u>Figure 12</u></b> : CyFlow Counter .....	21
<b><u>Figure 13</u></b> : Système volumétrique.....	21
<b><u>Figure 14</u></b> : Apogee Auto40 .....	22
<b><u>Figure 15</u></b> : HumaCount CD4 <sup>NOW</sup> .....	23
<b><u>Figure 16</u></b> : Pima CD4 .....	24
<b><u>Figure 17</u></b> : CyFlow miniPOC.....	25
<b><u>Figure 18</u></b> : MBio CD4 system.....	26
<b><u>Figure 19</u></b> : FACSPresto .....	26
<b><u>Figure 20</u></b> : Passing-Bablok des taux de CD4 entre FACSPresto et FACSCalibur .....	36
<b><u>Figure 21</u></b> : Pollock des taux de CD4 entre FACSPresto et FACSCalibur.....	37

**Figure 22** : Similarité des taux de CD4 entre FACSPresto et FACSCalibur..... 37

**Figure 23** : Passing-Bablok des pourcentages de CD4 entre FACSPresto et FACSCalibur.....38

**Figure 24** : Bland-Altman des pourcentages de CD4 entre FACSPresto et FACSCalibur .....39

**Figure 25** : Similarité des pourcentages de CD4 entre FACSPresto et FACSCalibur..... 39

**Figure 26** : Passing-Bablok des taux de CD4 entre FACSPresto et FACSCount..... 40

**Figure 27** : Pollock des taux de CD4 entre FACSPresto et FACSCount .....41

**Figure 28** : Similarité des taux de CD4 entre FACSPresto et FACSCount..... .....41

## **LISTE DES TABLEAUX**

<b><u>Tableau I</u></b> : Technologies de charge virale.....	<b>16</b>
<b><u>Tableau II</u></b> : Critères des techniques CD4 POC.....	<b>22</b>
<b><u>Tableau III</u></b> : Description comparative des technologies CD4 POC .....	<b>27</b>
<b><u>Tableau V</u></b> : Variabilité du FACSPresto.....	<b>35</b>

## SOMMAIRE

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>I. Rappel sur l'infection à VIH .....</b>	<b>3</b>
<b>I.1 Historique .....</b>	<b>3</b>
<b>I.2. Epidémiologie .....</b>	<b>3</b>
<b>I.2.1. Transmission du VIH.....</b>	<b>3</b>
<b>I.2.2. Prévalence.....</b>	<b>3</b>
<b>I.3. Structure du VIH.....</b>	<b>4</b>
<b>I.4. Réplication du VIH .....</b>	<b>6</b>
<b>I.5. Physiopathologie de l'infection à VIH .....</b>	<b>7</b>
<b>I.5.1. La primo-infection .....</b>	<b>7</b>
<b>I.5.3. La phase asymptomatique .....</b>	<b>8</b>
<b>I.5.4. Le stade SIDA .....</b>	<b>8</b>
<b>I.6. Immunologie du VIH .....</b>	<b>9</b>
<b>I.6.1. Immunopathogenèse du VIH .....</b>	<b>9</b>
<b>I.6.2. Réponse immunitaire anti VIH .....</b>	<b>11</b>
<b>I.6.2.1. Réponse immunitaire innée .....</b>	<b>12</b>
<b>I.6.2.2. Réponse immunitaire adaptative .....</b>	<b>12</b>
<b>I.7. Suivi biologique des personnes vivant avec le VIH .....</b>	<b>14</b>
<b>I.7.1. La charge virale .....</b>	<b>14</b>
<b>I.7.2. Numération des lymphocytes T CD4 .....</b>	<b>17</b>

<b>I.7.2.1. Intérêt de la numération des lymphocytes T CD4 .....</b>	<b>17</b>
<b>I.7.2.2. Technologies de numération des lymphocytes T CD4 .....</b>	<b>18</b>
<b>II. Matériel et méthodes .....</b>	<b>28</b>
<b>II.1. Matériels et réactifs.....</b>	<b>28</b>
<b>II.2. Méthodologie .....</b>	<b>28</b>
<b>II.2.1. Cadre d'étude .....</b>	<b>28</b>
<b>II.2.2. Population d'étude .....</b>	<b>28</b>
<b>II.2.3. Numération des lymphocytes T CD4 par cytométrie en flux : FACSCalibur .....</b>	<b>29</b>
<b>II.2.4. Numération des lymphocytes T CD4 par le FACSCount .....</b>	<b>31</b>
<b>II.2.5. Numération des lymphocytes T CD4 par le FACSPresto .....</b>	<b>32</b>
<b>II.2.6. Détermination des paramètres de la précision .....</b>	<b>33</b>
<b>II.2.7. Analyse statistique .....</b>	<b>33</b>
<b>III. Résultats et discussion</b>	
<b>III.1 Résultats .....</b>	<b>35</b>
<b>III.1.1 Caractéristiques de la population d'étude .....</b>	<b>35</b>
<b>III.1.2 Précision du FACSPresto .....</b>	<b>35</b>
<b>III.1.3 Comparaison entre le FACSPresto et la technique de référence, le FACSCalibur .....</b>	<b>35</b>
<b>III.1.4. Comparaison entre le FACSPresto et le FACSCount sur les taux de CD4 .....</b>	<b>40</b>
<b>III.2 Discussion .....</b>	<b>42</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>44</b>
<b>Références Bibliographiques.....</b>	<b>45</b>

## **Introduction**

Le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) découvert en 1981 s'est révélé, dès 1983, être la conséquence grave et tardive d'une infection à VIH (virus de l'immunodéficience humaine), causée par deux rétrovirus que sont les VIH des types 1 (VIH-1) et 2 (VIH-2). Avec plus de 34 millions de morts à ce jour, le VIH continue d'être un problème majeur de santé publique. Il touche plus de 36 millions d'individus à travers le monde dont 2,6 millions sont des enfants. L'Afrique subsaharienne est la région la plus touchée car elle héberge plus de 70% des individus vivant avec le VIH.

Le VIH cible principalement les lymphocytes TCD4, les détruit conduisant ainsi à l'affaiblissement du système immunitaire et favorisant la survenue d'infections et de maladies dites opportunistes. La récente implantation de traitements antirétroviraux (ARV) abordables et génériques dans les régions à ressources limitées fut une étape importante dans la lutte contre le VIH/SIDA. Aujourd'hui, l'objectif de l'OMS est de traiter toute personne diagnostiquée VIH positive avec une priorité portée sur les individus ayant un taux de CD4 < 350 cellules/mm<sup>3</sup> et ceux présentant des symptômes des stades 3 et 4 de l'OMS. Cette recommandation nécessite une meilleure accessibilité aux traitements et aux soins liés au VIH dans le but de diminuer considérablement les effets pathogènes et la transmission. La thérapie antirétrovirale a pour but de rendre la charge virale plasmatique (CV) indétectable (<50 copies/ml), ce qui favorise la restauration immunitaire, réduit le risque de sélection de virus résistants et la morbidité associée au VIH. Pour ce faire, les outils de suivi en laboratoire tels que la charge virale et la numération des lymphocytes T CD4 doivent être accessibles à toutes les personnes vivant avec le VIH. Dans ses dernières lignes directrices, l'OMS recommande préférentiellement de suivre l'efficacité thérapeutique avec la charge virale. Cependant cela tarde à être effective dans les pays à ressources limitées et principalement dans les zones les plus reculées. De ce fait, la numération des lymphocytes T CD4 demeure dans ces régions l'outil le plus commun pour le suivi des personnes vivant avec le VIH.

La cytométrie en flux est considérée de manière conventionnelle comme la méthode de référence pour la mesure du taux de lymphocytes T CD4. Les cytomètres standards tels que le FACSCalibur (Becton Dickinson) ou le Coulter Epics (Beckman Coulter) sont très fiables, très précis et permettent d'analyser de grand nombre d'échantillons par jour (+ de 200 tests/jour). Cependant, ils sont extrêmement coûteux et nécessitent un personnel hautement qualifié, une électricité stable, de l'air conditionné et une chaîne de froid pour le transport et le stockage des réactifs. Hélas, dans nos contextes de pays à ressources limitées, il est difficile de satisfaire

toutes ces exigences. Ce qui fait que la cytométrie en flux est réservée aux laboratoires de référence. Pour élargir l'accès de la prise en charge dans les pays à ressources limitées, des techniques dites alternatives ont été introduites avec le FACSCount qui fut le premier cytomètre entièrement dédié à la numération des lymphocytes T CD4 [55, 91]. La dernière décennie a vu le développement de cytomètres spécialisés tels que le CyFlow Counter, le Guava EasyCD4 et l'Apogee Auto40 [26, 57, 77, 102]. Ces techniques restaient relativement coûteuses et nécessitaient une électricité stable, une chaîne de froid entre autres exigences. Ainsi, des techniques dites Point-Of-Care (POC) ont été développées ces dernières années. Ces techniques CD4 POC sont simples et abordables, n'ont pas besoin de chaîne de froid et incluent le HumaCount CD4<sup>NOW</sup>, le Pima CD4, le CyFlow miniPOC, le Daktari CD4, le MBio CD4 et le FACSPresto [13, 22, 26, , 36, 99, 101-103].

Le FACSPresto est une nouvelle plateforme de numération des lymphocytes T CD4, répondant aux besoins spécifiques d'une utilisation sur le lieu de soin dans les régions défavorisées. Il est portable, alimenté par une batterie interne rechargeable, et fournit des résultats en valeur absolue et en pourcentage et donne le taux d'hémoglobine dans le sang, à partir d'une même cartouche jetable unique. Il utilise aussi bien le sang veineux que le sang capillaire. Les réactifs sont lyophilisés éliminant ainsi le besoin d'une chaîne de froid. L'entreprise affirme que l'instrument peut être manipulé dans des conditions environnementales extrêmes sans un besoin pour l'entretien de routine ou préventif pour le fonctionnement quotidien. Le FACSPresto a été préqualifié par l'OMS en Septembre 2014 [107]. Actuellement, il est en phase d'évaluation dans différentes zones. C'est dans cette optique que nous nous sommes proposé comme objectif d'évaluer le FACSPresto et spécifiquement de :

- Déterminer ses paramètres de précision (variabilité intra essai et variabilité inter essai) ;
- Déterminer sa concordance avec le FACSCalibur et avec le FACSCount ;
- Déterminer sa sensibilité et sa spécificité dans l'identification des patients devant être mis sous traitement ARV dans les différents seuils de mise sous traitement antirétroviral (200, 350 et 500).

**Chapitre I :**  
**GENERALITES**

## **I. Rappel sur l'infection à VIH**

### **I.1 Historique**

Le VIH a été découvert le 5 juin 1981 par le CDC aux États-Unis après l'annonce d'une recrudescence à Los Angeles, San Francisco et New York des cas de pneumonies à *Pneumocystis carinii* et de sarcomes de Kaposi. Ces deux maladies ont la particularité d'affecter les personnes immunodéprimées. Il portait le nom de « *Gay Syndrome* » car les premiers malades furent tous homosexuels. Une des premières causes suggérées de cette immunodépression était le “*poppers*”, un vasodilatateur très utilisé chez les homosexuels (37). Mais dans les mois qui suivirent, des toxicomanes par injections et des hémophiles furent infectées. Cette découverte révéla que le “*poppers*” n'était pas la cause, et une origine infectieuse fut admise. Il restait alors à trouver l'agent infectieux.

Une étude sur les cellules lymphoïdes ganglionnaires par le professeur Montagnier de l'Institut Pasteur de Paris en 1983, identifiait un rétrovirus humain qu'il dénommait “*Lymphadenopathy Associated Virus*” ou LAV [9]. Aux États-Unis, le Professeur Gallo et al identifiaient un autre virus similaire sous le nom de “*Human T-Lymphotropic Virus type 3*” ou HTLV3. En 1986, un autre virus apparenté mais génétiquement distinct était découvert chez des patients originaires d'Afrique de l'ouest et fut baptisé LAV2 [18]. Dans cette même année, une révision de la nomenclature a permis de les définir en VIH de type 1 (VIH-1) et VIH de type 2 (VIH-2).

### **I.2. Épidémiologie**

#### **I.2.1. Transmission du VIH**

Le VIH est présent dans de nombreux fluides organiques. On en trouve dans la salive, les larmes, et les urines mais à des concentrations insuffisantes pour que des cas de transmission soient enregistrés. Par contre des quantités de virus assez importantes pouvant entraîner une infection sont détectées dans le sang, le lait maternel, les sécrétions cervico-vaginales, le sperme et le liquide séminal. Il peut aussi se transmettre par contact avec du matériel contaminé (usagers de drogue par voie intraveineuse, transfusion sanguine et accidents professionnels) ou par une mère infectée à son enfant *in utero*, pendant l'accouchement et lors de l'allaitement [42].

#### **I.2.2. Prévalence**

De nos jours, l'infection à VIH est toujours considérée comme une pandémie. Selon les dernières estimations de l'OMS et de l'ONUSIDA en fin 2014, portaient à :

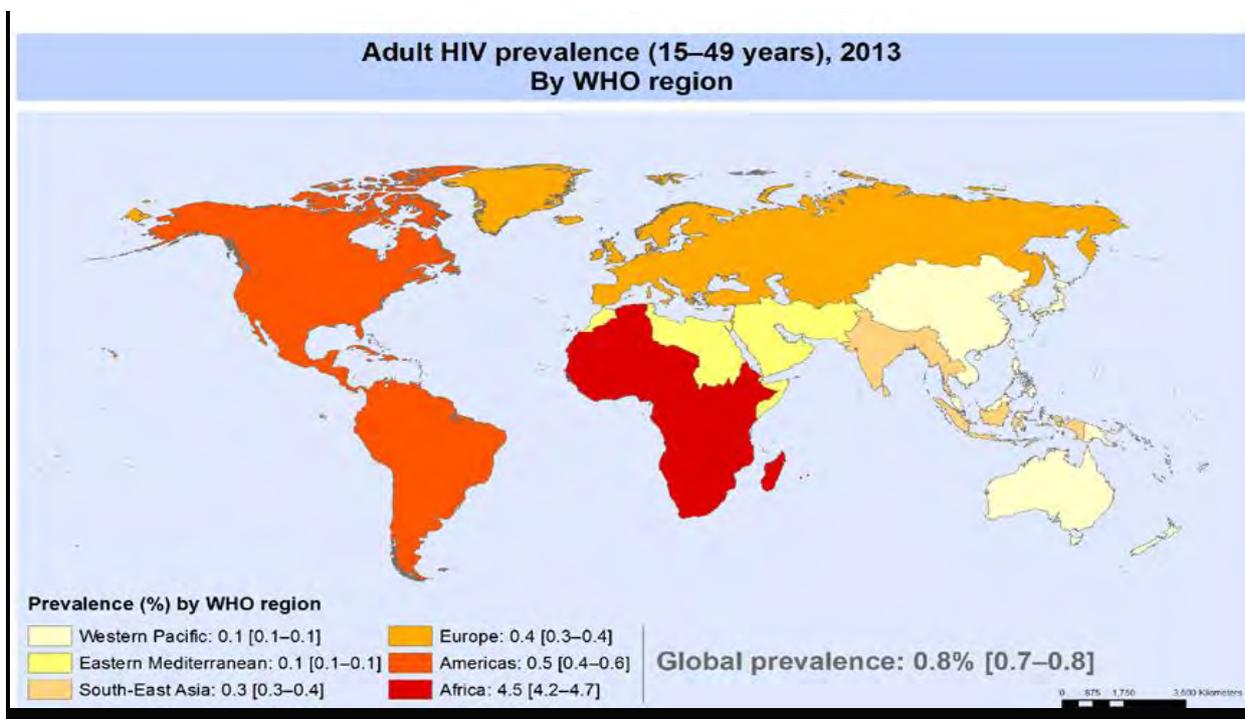
- 36.9 millions, le nombre de personnes vivant avec le VIH dans le monde

- 2,0 millions, le nombre de nouvelles infections
- 1,4 millions, le nombre de décès liés au VIH/SIDA [70 ; 68]

En juin 2015, 15,8 millions de personnes avaient accès au traitement. Parallèlement, bien que les nouvelles infections à VIH aient diminué, un nombre inacceptablement élevé de nouvelles infections à VIH et de décès liés au sida surviennent encore chaque année [71]

L'Afrique subsaharienne reste la région la plus touchée car concentre plus de 70% des personnes vivant avec le VIH dans le monde (Figure 1). Cependant, on assiste à une baisse de la prévalence du VIH en Afrique depuis 2000 qui atteignait 5,9% pour revenir à 5% en 2007 et être à 4,5% en 2013 [69 ; 70]. A l'échelle mondiale, le nombre de personnes vivants avec le VIH a augmenté par rapport aux années précédentes du fait de l'augmentation du nombre de personnes sous thérapie antirétrovirale. Par ailleurs, le nombre des nouvelles infections a connu un recul de 35% passant de 3,4 millions en 2001 à 2 millions en 2014 ; et le nombre de décès liés au SIDA ayant connu une baisse de près de 40% passant de 2,3 millions en 2005 à 1,4 millions en 2014 [71 ; 68].

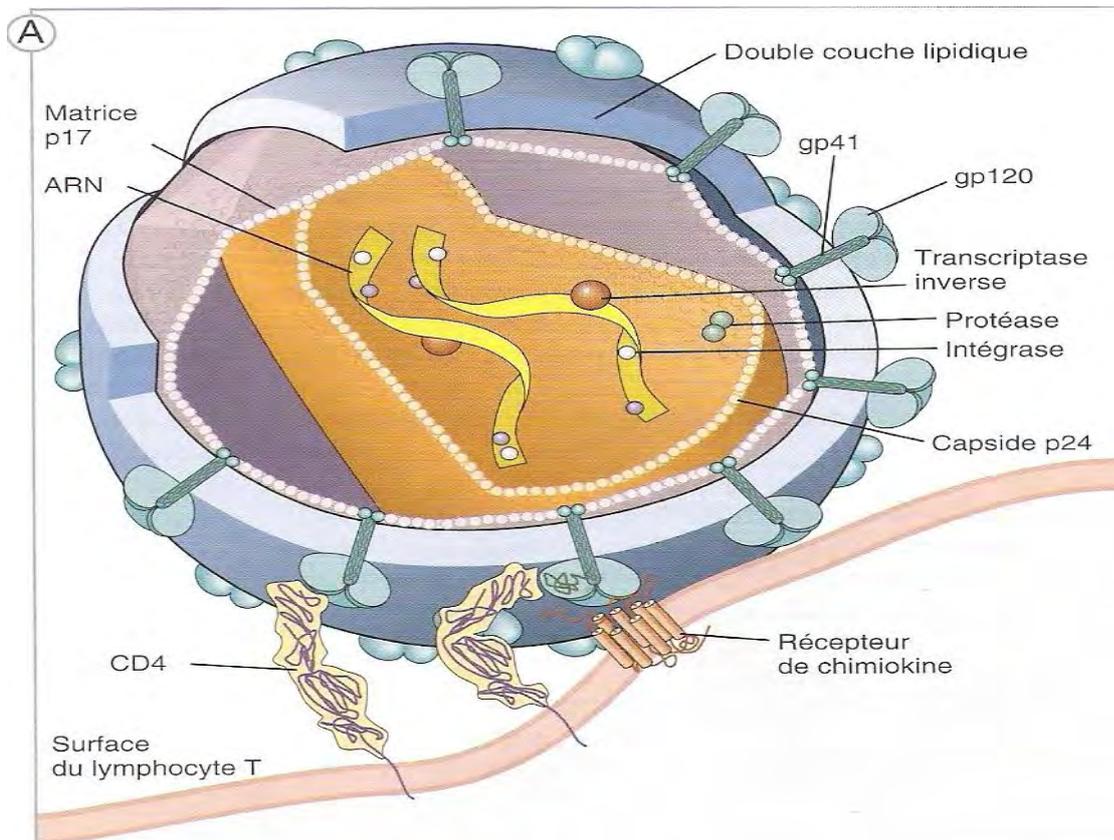
Au Sénégal, la prévalence globale est estimée à 0,7% ; mais reste élevée dans les groupes dits vulnérables tels que les travailleuses du sexe (18,5%), les hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes (18,5%) et les toxicomanes par voie intraveineuse (10,2%) [60].



**Figure 1** : Prévalence de l'infection à VIH chez les adultes en 2013 [68].

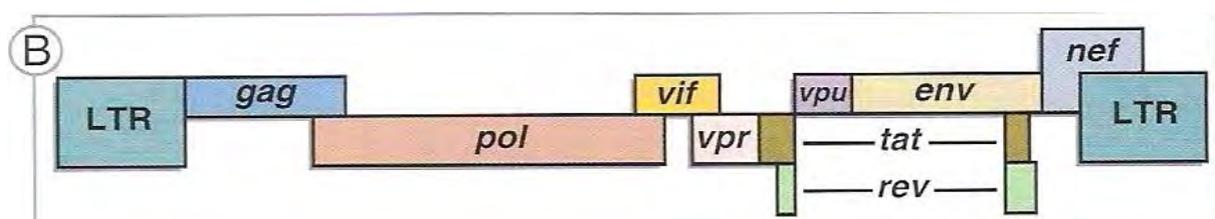
### I.3. Structure du VIH

Le VIH est un rétrovirus du genre des Lentivirus appartenant à la sous famille des *Lentivirinae* caractérisées par une évolution lente de la maladie. Les Lentivirus appartiennent à la famille des *Retroviridae*, regroupant les virus à ARN possédant une transcriptase inverse ou RT, capable de transcrire l'ARN viral en ADN bicaténaire proviral. Le VIH est d'un aspect globalement sphérique pour un diamètre variant de 90 à 120 nanomètres (Figure 2). L'enveloppe virale, constituée d'une bicouche lipidique, porte deux glycoprotéines : la gp120 membranaire et la gp41 transmembranaire. La gp120 présente une forte affinité avec le récepteur CD4 présent à la surface des cellules CD4<sup>+</sup>. C'est pour cette raison que le VIH n'infecte que ce type de cellules dont la majorité est représentée par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> [1]. A l'intérieur de l'enveloppe se trouve une matrice protéique composée de la protéine p17 et dans la matrice se trouve la capsid (p24) ou corps viral, composée de la protéine p24, qui renferme le génome du virus. Ce génome est constitué d'un simple brin d'ARN en double exemplaire accompagné d'enzymes que sont la transcriptase inverse, l'intégrase (p32) et la protéase (p10). Ces trois enzymes sont les principales cibles des traitements antirétroviraux, car elles sont spécifiques aux rétrovirus [1, 32].



**Figure 2** : Structure du VIH-1 [1]

Le génome du virus (Figure 3) est constitué de neuf gènes, les trois principaux sont les gènes *gag*, *pol* et *env* qui définissent la structure du virus et sont communs à tous les rétrovirus. Les six autres gènes *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, et *vpu* (*vpx* pour le VIH-2) codent les protéines régulatrices [1, 32].

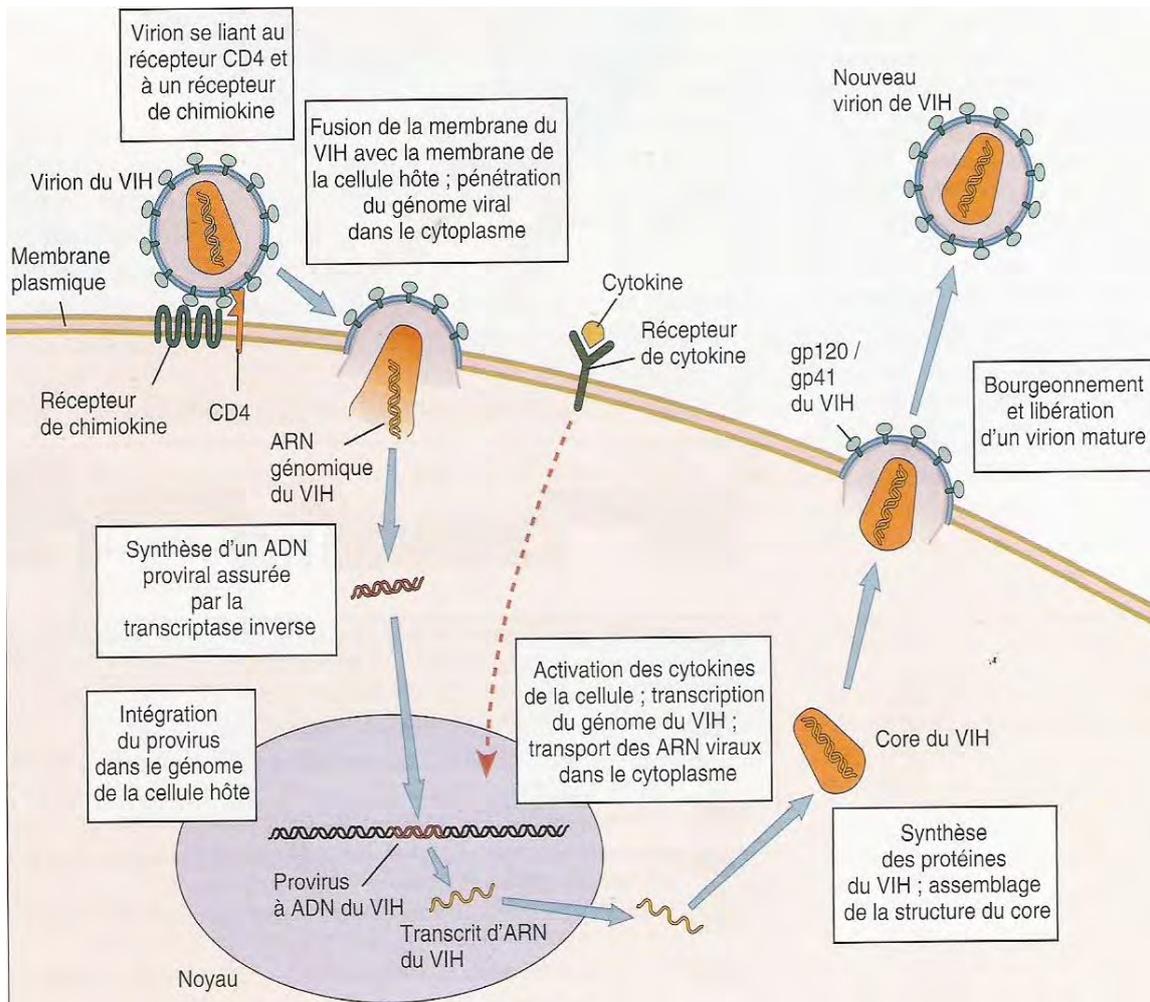


**Figure 3** : Génome du VIH-1 [1]

#### I.4. Réplication du VIH

Les cellules cibles du VIH sont celles présentant des récepteurs CD4 à leur surface. Ainsi, les lymphocytes T CD4+, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules microgliales cérébrales peuvent être infectées par le VIH, ce qui fait que la réplication virale a lieu dans plusieurs tissus [1]. La réplication du virus se déroule en plusieurs étapes (Figure 4). En effet, la protéine gp120 possède une zone de fixation à la protéine CD4. La fixation du

gp120 au CD4 conditionne l'ensemble des étapes suivantes permettant la pénétration de la nucléocapside virale dans le lymphocyte. La fixation de gp120 au CD4 permet de démasquer la protéine transmembranaire virale, la gp41. Celle-ci s'insère alors dans la membrane du lymphocyte permettant la fusion des deux membranes et ainsi l'entrée du corps viral dans le cytoplasme de la cellule hôte [32]. En réalité la molécule CD4 seule est insuffisante pour la pénétration du virus dans la cellule, ceci nécessite la présence de corécepteurs tels que le CXCR4 ou le CCR5. Ces corécepteurs ne sont pas des protéines spécifiques aux lymphocytes T CD4+, de nombreuses autres cellules en possèdent [2]. Une fois dans le cytoplasme, l'ARN du virus est rétro transcrit en ADNc double brin grâce à la reverse transcriptase. Cet ADN pénètre dans le noyau et grâce à l'intégrase p32, s'intègre au génome de la cellule hôte pour être ensuite transcrit en ARNm viraux. Cet ARN est traduit en trois précurseurs protéiques qui seront clivés par des protéases pour donner les différentes protéines du virus. Assemblées, ces protéines permettent la formation de nouveaux virions qui bourgeonnent de la cellule hôte, ce qui permet la libération dans le sang de nouveaux virus qui peuvent infecter de nouvelles cellules [2, 32, 1].



**Figure 4 : Cycle de réplication du VIH [1]**

## I.5. Physiopathologie de l'infection à VIH

L'évolution de l'infection par le VIH est dite persistante et productive (Figure 5), elle est caractérisée par différentes phases aboutissant à un déficit immunitaire [20 ; 41 ; 78].

### I.5.1. La primo-infection

C'est la première phase de l'infection. Elle correspond à la dissémination du virus dans l'organisme. Elle est le plus souvent asymptomatique. Cependant, dans 30 à 40 % des cas, 2 à 6 semaines après la contamination, elle se manifeste par un syndrome pseudo-grippal avec des signes non spécifiques tels que fièvre, adénopathies, myalgies, arthralgies, etc. Cette symptomatologie régresse spontanément au bout d'une à trois semaines. Au cours de cette phase, le virus se multiplie de façon importante et il en résulte une charge virale plasmatique élevée (jusqu'à plusieurs millions de copies d'ARN par ml de plasma) parfois associée à une diminution du taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Le système immunitaire développe à ce stade une

réponse cellulaire de type cytotoxique avec les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques du virus, précédant l'apparition des anticorps neutralisants [1, 20, 32].

### **I.5.3. La phase asymptomatique**

Il s'agit d'une phase caractérisée par une latence clinique (sans latence virologique). Cette période dure en moyenne 7 à 10 ans en l'absence de traitement. Le virus continue à se multiplier mais à un niveau moindre que celui de la primo-infection grâce aux réponses immunitaires cellulaire et humorale développées. Le virus va s'adapter à cette pression immunitaire par l'apparition de nouveaux variants induisant à leur tour de nouvelles réponses immunitaires spécifiques. A terme, les réponses cellulaire et humorale sont dépassées et ne permettent plus le contrôle de la réplication virale. Le taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> chute et coïncide avec l'apparition des symptômes [1, 32, 78].

### **I.5.4. Le stade SIDA**

Les manifestations cliniques vont apparaître avec le déclin des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Il se caractérise par la survenue d'infections opportunistes (pneumocystose, toxoplasmose, infections à mycobactéries, atteintes viscérales par le cytomégalovirus, *etc.*) ou de proliférations cellulaires (sarcome de Kaposi, lymphomes B, cancer du col utérin, *etc.*). Du point de vue biologique, la charge virale est très élevée avec un taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> inférieur à 200 cellules/mm<sup>3</sup>, signes de la profonde immunodépression [1, 32, 41].

Pendant plusieurs années, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> semblent se renouveler rapidement malgré leur destruction par le virus, jusqu'à ce que l'épuisement des organes lymphoïdes centraux (thymus) ne permette plus leur régénération. La destruction des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> est bien souvent due à l'hyper-activation de ces cellules, par interaction avec certaines structures du virus, et non à une destruction directe par le VIH. Après dix à quinze ans d'évolution spontanée sans traitement, le sujet est immunodéprimé (stade SIDA), des pathologies infectieuses ou tumorales rares (dites opportunistes) surviennent et peuvent conduire au décès. Actuellement, les traitements antirétroviraux évitent ou retardent l'évolution vers le stade SIDA, en maintenant les niveaux de réplication du virus au plus bas possible. La destruction du système immunitaire et la progression clinique avec apparition de maladies opportunistes sont directement liées au taux sanguin des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> du patient. L'efficacité des traitements antirétroviraux est évaluée par le niveau de réplication virale mesurée par la charge virale VIH (taux d'ARN plasmatique), et accessoirement par la mesure du taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et par l'état clinique du patient [7, 4, 20, 41, 78].

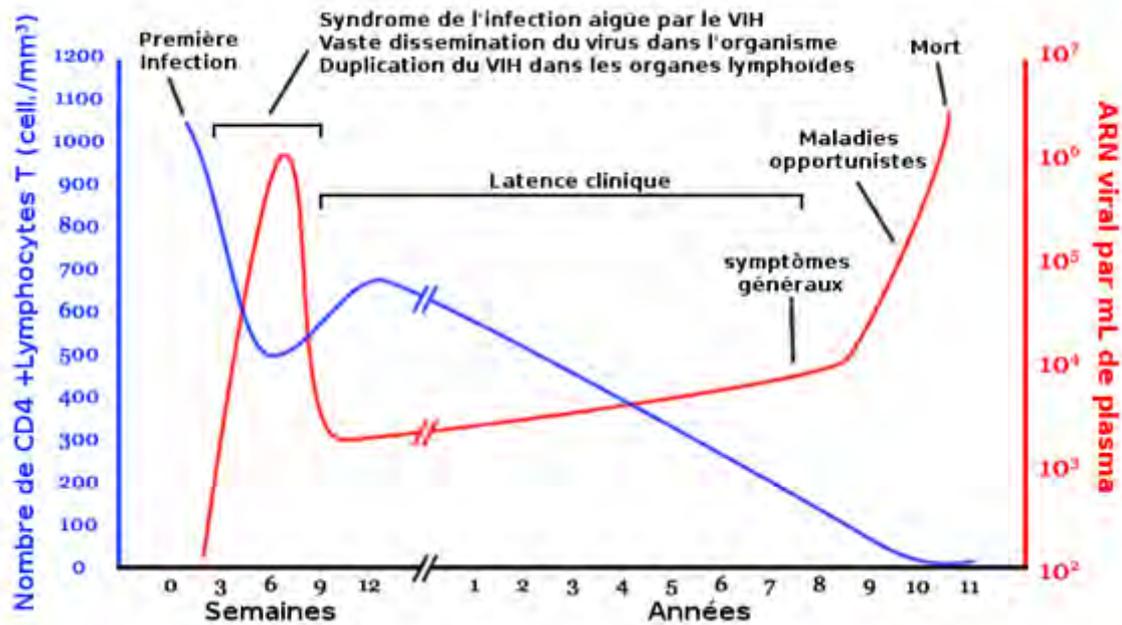
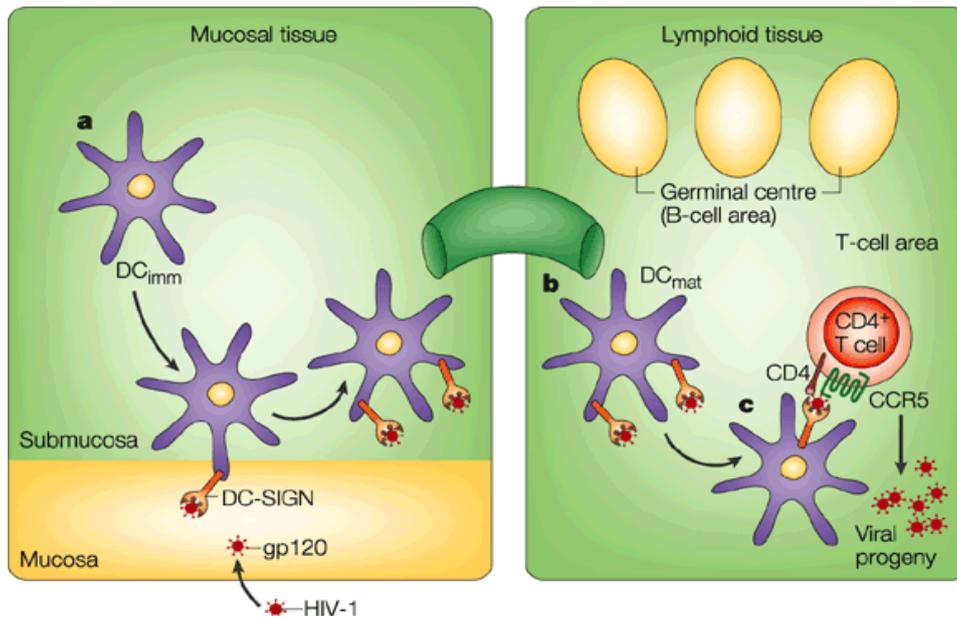


Figure 5 : Evolution typique de l'infection par VIH-1 [27].

## I.6. immunologie du VIH

### I.6.1. immunopathogénèse du VIH

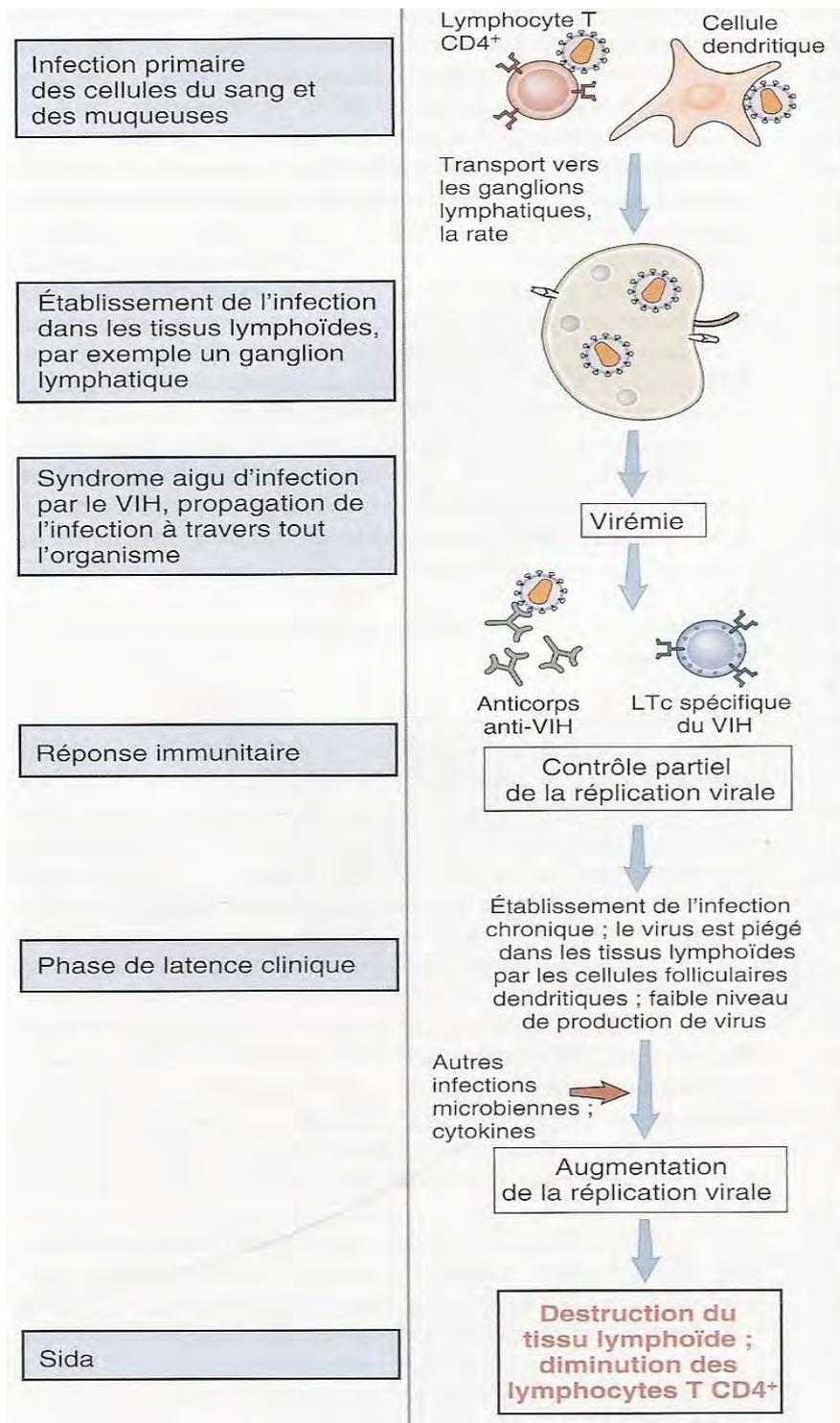
Le VIH provoque une infection lente des cellules du système immunitaire qui peut être réactivé, ce qui produit des virus infectieux. Cette production virale entraîne la mort des cellules infectées conduisant au déficit manifeste du système immunitaire correspondant à la phase SIDA. Après l'infection, une brève virémie aiguë peut survenir et l'hôte y répond comme à toute infection virale légère. Les cellules dendritiques qui jouent le rôle de réservoirs de l'infection, peuvent capturer le virus lorsqu'il pénètre à travers les épithéliums par l'intermédiaire d'un récepteur appelé DC-SIGN (CD209) et le transporter vers les organes lymphoïdes périphériques (figure 6) où une infection systémique est établie [1, 28, 29].



**Figure 6 :** Rôle du récepteur DC-SIGN dans la pathologie du VIH [29]

Pendant la phase d'intense infection, la réplication virale s'accélère et la charge virale massive conduit à une large dissémination du virus à travers l'organisme, aboutissant à la diminution du nombre de cellules TCD4<sup>+</sup>. Trois ou quatre mois après, les réponses humorales et cellulaires se développent. Ce qui limite la réplication virale et établit une infection chronique persistante [28, 40]. La déplétion en cellules TCD4<sup>+</sup> qui suit l'infection à VIH est due à un effet cytopathogène direct du virus, qui entraîne la production de particules virales, ainsi que la mort de cellules non infectées par un mécanisme indirect (apoptose). Les cellules TCD4<sup>+</sup> jouent un rôle centrale dans la réponse immunitaire, leur réduction aboutit donc au développement de la phase symptomatique de la maladie, à la survenue des infections opportunistes et au SIDA [1, 28, 40].

L'expression du génome viral et la production de protéines virales peuvent interférer avec la machinerie de synthèse des lymphocytes T. Par conséquent, les lymphocytes T infectés dans lesquels se réplique le virus sont détruits au cours de ce processus (figure 7). Bien que l'infection à VIH conduise éventuellement à la mort des individus infectés, le cours de la maladie peut varier largement. La période entre l'infection et l'apparition du SIDA varie de 8-10 ans chez les progressseurs typiques, à moins de 3 ans chez les progressseurs à court terme et à plus de 15 ans chez les progressseurs à long terme [39]. Plusieurs facteurs peuvent affecter la progression de la maladie chez les sujets infectés incluant les caractéristiques génétiques du virus infectant et de l'hôte, de même que les aspects qualitatif et quantitatif des réponses immunitaires dirigées contre le VIH [19, 90].



**Figure 7:** Pathogenèse de l'infection par le VIH [1]

### 1.6.2. Réponse immunitaire anti VIH

L'infection par le VIH fait intervenir l'immunité innée et l'immunité acquise, avec une prépondérance de cette dernière

### **I.6.2.1. Réponse immunitaire innée**

L'immunité innée agit de manière non spécifique contre les pathogènes invasifs et peut jouer un rôle important dans le contrôle de l'infection avant que l'immunité adaptative ne se développe. Par conséquent, les réponses immunitaires innées sont généralement plus rapides, mais en même temps moins complètes comparées aux réponses adaptatives. Les facteurs solubles ayant une activité anti-VIH incluent le complément, les  $\beta$  chimiokines telles que RANTES (*Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*), MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$  (*Macrophage Inflammatory Protein*), l'activité non cytotoxique des cellules TCD8<sup>+</sup> et les cytokines telles que le TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor*), les interférons IFN- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ . Les réponses innées cellulaires qui peuvent potentiellement protéger contre le VIH incluent entre autres les neutrophiles, les cellules Natural killer, les cellules productrices d'interféron et les cellules dendritiques [51, 87].

### **I.6.2.2. Réponse immunitaire adaptative**

L'immunité adaptative fait intervenir quant à elle des réponses humorale et cellulaire.

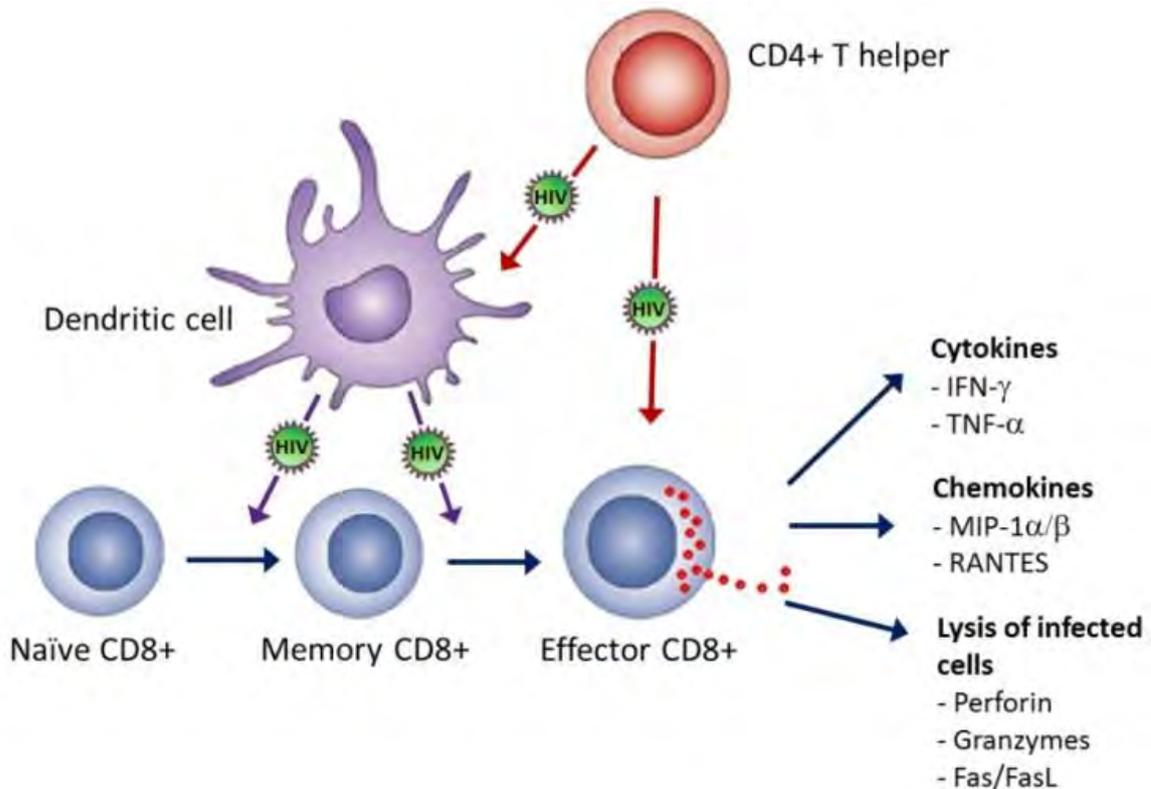
La réponse humorale est assurée par les anticorps anti-VIH. Parmi eux, il y a les anticorps anti-*gp120* qui se fixent aux spicules et empêchent l'adhésion des particules virales aux cellules cibles [89].

La réponse cellulaire est assurée par les lymphocytes T cytotoxiques (figure 8) qui reconnaissent les cellules infectées et les détruisent avant que celles-ci n'aient fabriqué de nouvelles particules virales [8].

Les cellules infectées présentent des épitopes viraux par leurs molécules du CMH-I et déclenchent ainsi une réponse immunitaire cytotoxique. Une activation des cellules T restreintes par les molécules du CMH-II induit une libération d'interleukines et une activation de cellules B suivies de la production d'anticorps. La liaison des anticorps aux particules virales permet la digestion de ces dernières par les macrophages. On observe une diminution progressive mais incomplète du nombre de virus dans le sang liée aux effets de la réponse immunitaire : les lymphocytes TCD8<sup>+</sup> cytotoxiques détruisent les lymphocytes TCD4<sup>+</sup> infectés avant qu'ils ne libèrent des virus ; les anticorps neutralisants empêchent l'infection des lymphocytes Th par les virions libérés. Par contre, la haute fréquence des mutations génétiques du VIH conduit à l'échappement du virus et à l'échec des anticorps de prévenir la progression de la maladie [8, 15, 45, 81, 104].

Néanmoins, sous la forte pression sélective du système immunitaire, de nouvelles mutations émergent continuellement pendant la réplication du VIH et favorisent l'apparition de

variants. Les variants fonctionnels peuvent se propager sans obstacle jusqu'à l'adaptation du système immunitaire aux nouvelles souches. Le VIH entraîne une infection chronique car les variations incessantes du virus font que le système immunitaire ne parvienne pas à maîtriser la subversion du virus, chaque nouveau variant entraîne la destruction des lymphocytes TCD4<sup>+</sup> entraînant la baisse progressive de ces cellules. Le virus persiste en latence dans les réservoirs, et les réponses des cellules T cytotoxiques se détériorent avec la progression de la maladie et la disparition des cellules TCD4<sup>+</sup> [2, 15, 109].



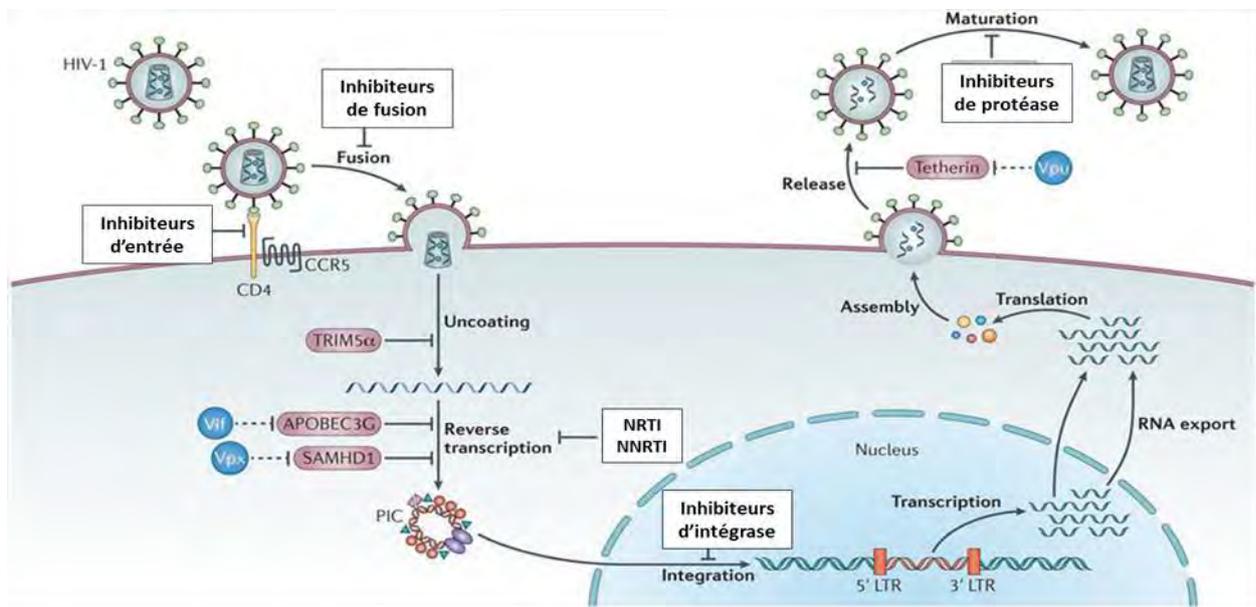
**Figure 8:** Réponse induite par les lymphocytes T CD8 [108]

## I.6. Traitements

Depuis l'arrivée du premier médicament antirétroviral AZT en 1996, les traitements contre le VIH/SIDA ont beaucoup évolué. Les progrès dans l'arsenal de la thérapie antirétrovirale ont réduit la charge virale du VIH, la survenue d'infections opportunistes (IO), et les taux de décès dus au SIDA, en particulier chez les patients avec augmentation du nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> [8, 14]. Les ARV interfèrent à différents niveaux du cycle évolutif du VIH (Figure 9) : d'une part, les enzymes du VIH nécessaires à sa réplication et à l'assemblage des constituants et, d'autre part, ses mécanismes d'entrée dans la cellule [63]. Depuis 1996, le traitement habituel, qualifié de trithérapie puisque associant trois molécules, a contribué de

façon significative au contrôle de l'infection et à la chute de la mortalité due au SIDA [72]. Ces médicaments confèrent une meilleure protection contre les infections opportunistes mais peuvent être à l'origine d'effets secondaires d'intensité variable, passagers ou permanents, pouvant conduire à l'arrêt ou surtout la modification du traitement, sachant que, correctement suivis, ils ont une efficacité relativement importante [21, 52, 79].

A ce jour, 37 médicaments antirétroviraux (ARV) sont approuvés par la FDA américaine pour le traitement de l'infection à VIH. Ces ARV sont regroupés en six classes que sont les inhibiteurs d'entrée, les inhibiteurs de fusion, les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI), les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI), les inhibiteurs de protéase et les inhibiteurs d'intégrase [100].



**Figure 9** : sites d'intervention des ARV dans le Cycle de réplication du VIH

### I.7. Suivi biologique des personnes vivant avec le VIH

Une fois la séropositivité établie, un traitement doit être débuté selon les recommandations de l'OMS et un suivi régulier de l'infection doit être effectué, pour assurer une bonne prise en charge de la maladie et ainsi évaluer au mieux l'état du malade. Deux facteurs sont pris en compte :

- le taux de lymphocytes T4, pour définir le niveau de l'infection et définir le seuil d'initiation de la thérapie antirétrovirale ;
- la charge virale, indiquant le nombre de virions dans l'organisme et, par voie de conséquence, la vitesse de réplication du VIH dans l'organisme, permettant ainsi de prédire l'évolution de la maladie [4, 7].

### **I.7.1. La charge virale**

La charge virale est définie en mesurant la concentration de l'ARN viral dans le sang par le principe de réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Elle est exprimée en nombre de copies par millilitre de plasma (copies/ml). La charge virale permet de suivre la progression de l'infection au VIH et l'efficacité du traitement du VIH. Le traitement efficace du VIH a pour but de faire baisser la charge virale à un niveau indétectable, ce qui réduit le risque de transmission du VIH. Toutefois, la transmission du VIH demeure possible lorsque la charge virale est indétectable parce qu'il reste assez de virus dans le sang et les autres liquides corporels pour que le VIH se transmette. La charge virale est l'outil le plus sensible pour évaluer l'efficacité thérapeutique, car elle permet de détecter et de prévenir précocement l'échec virologique de la thérapie antirétrovirale. La différence entre deux mesures de charge virale espacées dans le temps permet d'évaluer la vitesse de réplication du VIH et, par voie de conséquence, la progression de l'infection. Il y a un lien direct entre la charge virale et le niveau du déficit immunitaire, occasionné principalement par la diminution des lymphocytes T CD4 [52, 80].

Différentes technologies de charge virale existent incluant celles à base d'acides nucléiques (NAT) et d'autres non basées sur les acides nucléiques (tableau I). Pour élargir l'accès à ce test capital au suivi des patients sous thérapie antirétrovirale, des techniques de charge virale Point-Of-Care (POC) ont été développées et d'autres sont toujours en phase de développement. Actuellement, seul le test semi-quantitatif SAMBA-VIH est disponible sur le marché [99].

**Tableau I: Technologies de charge virale** (modifié à partir de 99)

<b>Technologies basées sur les acides nucléiques</b>
COBAS® Taqman v2.0 (Roche Molecular System)
Abbot RealTime HIV-1 (Abbot)
VERSANT® HIV RNA 1.0 (kPCR) (Siemens Healthcare Diagnostics)
artus™ HIV-1 QS-RGQ (QIAGEN N.V.)
NucliSENS EasyQ® HIV-1 v2.0 (bioMérieux)
VERSANT® HIV-1 RNA v3.0 (Siemens Healthcare Diagnostics)
<b>Technologies non basées sur les acides nucléiques</b>
ExaVir™ Load version 3.0 (Cavidi AB)
HIV-1 p24 Ultra ELISA (PerkinElmer) (RUO)
<b>Plateformes “POC” de charge virale</b>
SAMBA I & SAMBA II (Diagnostics for the Real World Ltd)
<b>Plateformes “POC” de charge virale non encore sur le marché</b>
Alere q system (Alere)
Liar™ Analyser (IQuum Inc)
EOSCAPE-HIV™ Rapid RNA Assay system (Wave 80 Biosciences)
Truelab™ Real Time micro PCR System (Molbio Diagnostics Pvt Ltd)
GeneXpert® System (Cepheid)
<b>Autres technologies de charge virale non encore sur le marché</b>
NWGHF Savanna Viral Load Test and Platform (Northwestern Global Health Foundation)
Viral Load using BART (Bioluminescent Assay in Real-Time) technology (Lumora Ltd)
RT CPA (Cross Priming Amplification) HIV-1 Viral Load Test (Ustar Biotechnology)
Gene-RADAR® (Nanobiosym® Diagnostics)
ZIVA™ (Cavidi)
Genedrive™ (Epistem Ltd)

## **I.7.2. Numération des lymphocytes T CD4**

### **I.7.2.1. Intérêt de la numération des lymphocytes T CD4**

Les lymphocytes T CD4 encore appelés lymphocytes T auxiliaires ou T « helper » sont un sous-ensemble de lymphocytes T qui expriment à leur surface la glycoprotéine CD4. Ils jouent un rôle central dans la réponse immunitaire. Ils participent à l'activation des lymphocytes T CD8, à la maturation des lymphocytes B et des macrophages (Abbas et Lichtman, 2005). Cibles du VIH, les lymphocytes T CD4 reconnaissent les antigènes peptidiques présentés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II exprimées sur la surface des cellules présentatrices d'antigène (CPA) induisant ainsi la réponse immunitaire [95]. Le VIH infecte les lymphocytes T CD4 et les détruit. Ceci entraîne un affaiblissement progressif du système immunitaire menant ultimement au syndrome d'immunodéficience acquise ou SIDA. Le taux normal de lymphocytes T CD4 chez l'adulte sain est compris entre 500 – 1500 cellules/mm<sup>3</sup>. On considère que :

- jusqu'à 500 CD4/mm<sup>3</sup> : le patient peut vivre dans des conditions normales, un traitement est cependant recommandé
- à partir de 350 CD4/mm<sup>3</sup> : un traitement antiviral est indispensable, le résultat attendu étant la baisse de la charge virale permettant la remontée du taux de lymphocytes T CD4
- en dessous de 200 CD4/mm<sup>3</sup> : le patient est fortement immunodéprimé et a un risque important de souffrir de multiples maladies opportunistes liées au SIDA. Le traitement antirétroviral ainsi qu'une antibioprophylaxie est alors indispensable pour éviter ces complications.

Chez les patients infectés par le VIH, la surveillance du taux de lymphocytes T CD4 du sang périphérique permet :

- d'évaluer le degré de détérioration immunitaire et la rapidité de la progression vers le stade SIDA ;
- de définir, à l'aide des manifestations cliniques, le moment propice pour initier la thérapie antirétrovirale selon les recommandations de l'OMS ;
- d'envisager la mise en route de traitements préventifs contre les infections opportunistes ;
- et d'évaluer l'efficacité thérapeutique en l'absence de la charge virale.

Chez les sujets adultes, on mesure le taux absolu de lymphocytes T CD4 alors que chez les enfants de moins de 5 ans et les nourrissons, le pourcentage de lymphocytes T CD4 par rapport aux lymphocytes totaux est plus instructif [32].

#### **I.7.2.2. Technologies de numération des lymphocytes T CD4**

La cytométrie en flux est considérée comme étant la technique de référence. Cependant, les cytomètres en flux standards tels que FACSCalibur (Becton Dickinson) et Cytomics FC 500 (Beckman Coulter) entre autres et leurs réactifs coûtent chers et nécessitent aussi des contrats de maintenance coûteux. Par ailleurs, ils requièrent un personnel hautement qualifié, une électricité stable, de l'air conditionné pour maintenir une température ambiante et une chaîne de froid pour le transport et le stockage des réactifs. Ce qui limite son utilisation dans les pays à ressources limitées. C'est ainsi que des techniques dites alternatives ont été développées pour élargir l'accès du suivi des personnes vivant avec le VIH. Ces techniques incluent des méthodes manuelles (Dynabeads et CytoSpheres) et des méthodes automatisées comprenant des cytomètres spécialisés (FACSCount, Apogee Auto40 & CyFlow Counter) et des techniques dites POC (HumaCount CD4<sup>NOW</sup>, Pima CD4, CyFlow miniPOC, MBio CD4, FACSPresto, *etc.* [36, 83, 99]. Un des défis lié aux techniques alternatives est de bien différencier les lymphocytes T CD4 des monocytes, qui, eux aussi, expriment la molécule CD4 sur leur surface. L'incapacité à distinguer ces deux populations cellulaires contribuerait à surestimer le taux de lymphocytes T CD4, impactant sur l'accessibilité au traitement de ceux qui peuvent en avoir besoin.

##### **➤ La cytométrie en flux**

En raison de la justesse, de la précision et de la reproductibilité de cette méthode, la cytométrie en flux est considérée comme la méthode de référence pour la numération des lymphocytes T CD4. Bien que les instruments du commerce proposés par différents fabricants soient coûteux, cette technologie permet d'analyser rapidement un très grand nombre d'échantillons tout en offrant une grande polyvalence d'utilisations dans le domaine biomédical, la numération des CD4 n'est qu'une utilisation parmi tant d'autres. La numération des CD4 par cytométrie en flux est relativement complexe, techniquement exigeante et coûteuse. Cependant, de nouvelles techniques de traitement des échantillons ont rendu l'utilisation de la cytométrie en flux possible pour les milieux à ressources limitées. Toutefois, la rentabilité de cette technologie demeure étroitement liée à un entretien soutenu. De plus, il est essentiel que les opérateurs de cytomètres en flux soient qualifiés dans tous les aspects

techniques et biologiques de la numération CD4. Bien que le coût des instruments constitue un frein à l'utilisation répandue de cette technique, la venue prochaine d'instruments portatifs simples peut modifier cette situation. Les cytomètres standards comme le FACSCalibur (Figure 10) utilisent généralement la méthode double plateforme, car fournissent le pourcentage de lymphocyte T CD4 (CD4%). Ainsi, le taux absolu de lymphocytes T CD4 est obtenu en faisant appel au total des lymphocytes fourni par le compteur hématologique. Pour réduire les erreurs qui peuvent être générées par l'utilisation de deux appareils, l'utilisation de microbilles (comme le TRUCount) a été introduit pour permettre au FACSCalibur de fournir le taux absolu de CD4 en simple plateforme [35, 65, 85].



**Figure 10 : FACSCalibur**

➤ **Méthodes manuelles**

Les méthodes présentement disponibles utilisent la microscopie optique ou à fluorescence et comprennent le CytoSpheres (Coulter Corporation, E-U) et le Dynabeads (Dynal AS, Norvège). De plus, elles requièrent d'autres équipements tels que les centrifugeuses et des dispositifs magnétiques. Ces tests sont conçus pour répondre aux exigences des laboratoires qui ont peu de ressources et qui ont une très faible quantité d'échantillons à traiter. Toutefois, leurs coûts d'opération ne sont pas toujours inférieurs aux méthodes automatisées. Le déplacement du seuil d'initiation du traitement de 200 à 350 et maintenant à 500 CD4/mm<sup>3</sup> associé à leur faible concordance dans les taux de CD4 élevés font que les méthodes manuelles sont de moins en moins adéquates pour le suivi des personnes vivant avec le VIH [6, 23, 24].

➤ **Les cytomètres spécialisés**

Les cytomètres spécialisés sont des systèmes simple plateforme conçus exclusivement pour la numération des lymphocytes T CD4. Ces instruments sont plus faciles à utiliser et moins chers que les cytomètres classiques. Cependant, ils n'offrent aucune flexibilité dans les

analyses ou le choix des réactifs et leur coût d'opération peut être élevé. Ils comprennent le FACSCount, le CyFlow Counter, l'Apogee Auto40 et le Guava EasyCD4 (qui n'est plus produit).

- **FACSCount (Becton Dickinson)**

Le FACSCount (Figure 11) est un système basé sur le principe de la cytométrie en flux. C'est le premier cytomètre de flux dédié à la numération des cellules T CD4 et est largement utilisé dans les pays à ressources limitées depuis son introduction en 1996 [55, 91]. C'est le seul système utilisant des microbilles parmi les techniques alternatives. En fonction des réactifs et du logiciel utilisés, il fournit le taux absolu de lymphocytes T CD4 soit le taux absolu de lymphocytes T CD4 associé au CD4%. Les réactifs sont constitués de tubes contenant des anticorps monoclonaux et une quantité connue de billes. Le FACSCount présente une très bonne précision, une bonne concordance avec le FACSCalibur et peut analyser 50 échantillons/jour. Le FACSCount est donc adapté au suivi des adultes et enfants vivant avec le VIH. Cependant, l'appareil et sa maintenance coûtent chers, et il nécessite un personnel qualifié, une électricité stable, de l'air conditionné et une chaîne de froid pour le transport et le stockage de réactifs [25, 54, 76, 101, 103].



**Figure 11 : FACSCount (Becton Dickinson)**

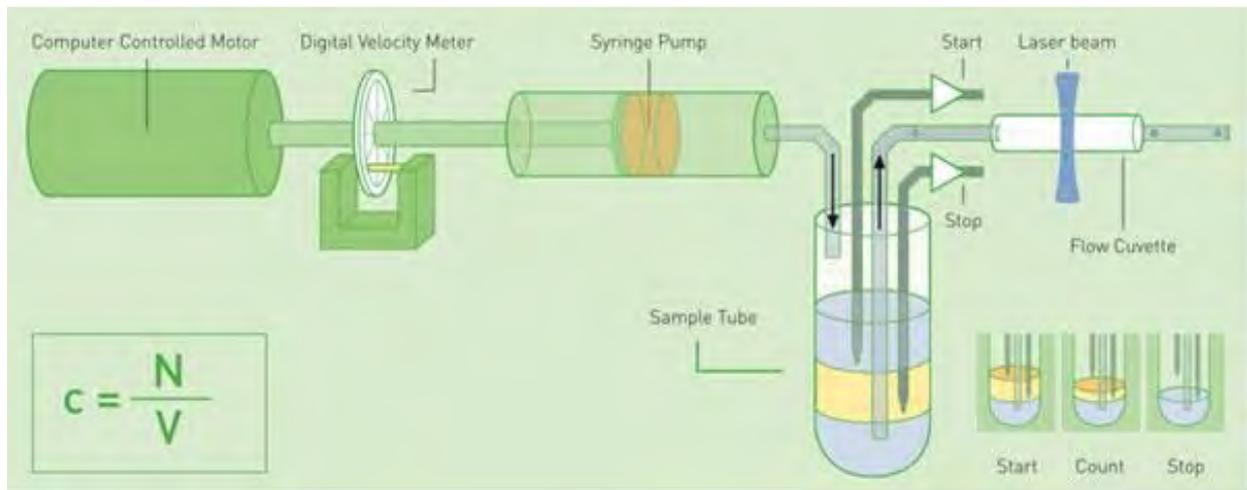
- **CyFlow Counter (Partec – Sysmex)**

Le CyFlow Counter (Figure 12) est un instrument simple plateforme, basé sur le principe de cytométrie en flux. Il utilise le comptage volumétrique absolu afin d'éliminer l'utilisation des microbilles fluorescentes coûteuses. L'approche volumétrique fournit le taux de lymphocytes T CD4 en analysant les cellules dans un volume fixe, défini par la distance entre

deux électrodes introduites dans le tube de l'échantillon (Figure 10). Selon les réactifs, il fournit soit le taux absolu de CD4, soit le taux absolu de CD4 associé au CD4%. L'appareil utilise des réactifs lyophilisés éliminant ainsi tout besoin d'une chaîne de froid. Le CyFlow Counter présente une bonne précision et une bonne concordance avec les cytomètres standards et peut analyser tests/jour [31, 56, 102, 74].



**Figure 12 : CyFlow Counter**



**Figure 13: système volumétrique**

- **Apogee Auto40 (Apogee Flow System)**

L'Apogee Auto40 (Figure 14) est un cytomètre en flux simple plateforme utilisant le système volumétrique. Il fournit le taux de CD4 et le CD4%. Il utilise des réactifs thermorésistants constitués d'anticorps monoclonaux lyophilisés. Le système Apogee est un instrument robuste initialement conçu pour les environnements militaires. L'Apogee Auto40 est un système à débit moyen capable d'analyser 50 échantillons par jour. L'Auto40 présente une bonne précision à l'image des autres cytomètres. Les résultats (taux de CD4 et CD4%) fournis par l'Apogee Auto40 montrent une bonne concordance avec ceux fournis par les cytomètres

standards comme le FACSCalibur et aussi avec ceux fourni par le FACSCount. Il est convenable pour le suivi des adultes et enfants vivant avec le VIH. Il peut aussi être utilisé dans les contrôles de qualité itinérant du fait de sa mobilité [26 ; 47 ; 58 ; 59].



**Figure 14: Apogee Auto40**

➤ **Les technologies CD4 Point-of-care (POC)**

Les cytomètres conventionnels ainsi que les cytomètres dédiés ne sont pas toujours accessibles en raison de leur coût et leurs exigences. C'est ainsi que pour améliorer l'accès à la numération des lymphocytes T CD4, des technologies dites CD4 POC ont été introduites. Par conséquent, l'OMS a recommandé le développement et l'utilisation des POC pour assurer rapidement, à moindre coût avec des résultats fiables le suivi des patients vivant avec le VIH dans les régions éloignées où l'accès aux services de laboratoires est limité. Une technologie CD4 Point-of-Care (POC) peut être définie comme une technologie simple qui donne un taux de CD4 en un temps réduit et ne nécessitant pas de personnel qualifié. Le tableau II résume les critères proposés par les experts de l'OMS, regroupés sous l'acronyme ASSURED, pour définir les technologies CD4 POC [36, 106].

**Tableau II : Critères des techniques CD4 POC**

Critères	Recommandations
<b>A : Abordable</b>	Appareil abordable, coût test < 5\$
<b>S : Sensible</b>	99% par rapport au seuil de traitement
<b>S : Spécifique</b>	98% par rapport au seuil de traitement
<b>U : Facile à Utiliser</b>	Minimum e formation et d'intervention, automatisé et portable
<b>R : Robuste</b>	Pas de chaine de froid, réactif thermostable, calibration automatique, résultat disponible dans les 30 minutes
<b>E : Sans Equipement</b>	Alimenté par batterie interne, solaire
<b>D : Disponible</b>	Approuvé et commercialisé

Il existe toute une gamme de technologies CD4 POC comprenant le HumaCount CD4<sup>NOW</sup>, le Pima CD4, le CyFlow miniPOC, le MBio CD4, le FACSPresto entre autres (Tableau III). L'utilisation des technologies CD4 POC, notamment avec le Pima CD4, a permis de réduire la proportion de patients perdus de vue et favoriser l'initiation rapide du traitement des patients éligibles.

- **HumaCount CD4<sup>NOW</sup> (Human Diagnostic)**

Introduit en 2008 sous le nom PointCare NOW, le HumaCount CD4<sup>NOW</sup> combine un cytomètre en flux mis à niveau dans un système d'hématologie commercial (Figure 15). Le HumaCount CD4<sup>NOW</sup> est un système volumétrique, simple plateforme entièrement automatisé qui fournit le taux de CD4 et le CD4% ainsi que les paramètres hématologiques. L'analyse de l'échantillon dure 8 min et est réalisée directement à partir du tube de sang fermé, ce qui réduit le risque d'infection. Les réactifs, thermostables, sont constitués d'anti-CD4 couplés à des particules d'or colloïdal, ce qui confère aux lymphocytes T CD4 une réfraction unique qui les différencie des monocytes [44, 57, 98, 83]. Les données regroupant cinq évaluations indépendantes ont montré une faible concordance par rapport aux cytomètres standards avec une surestimation de 35% et une sensibilité inférieure à 65% dans l'identification des patients éligibles au traitement [13]. Une étude plus récente avec un échantillonnage limité indique que la performance de l'instrument a été amélioré [37]. Cependant, d'autres études seront nécessaires avant de recommander son utilisation.



**Figure 15 : HumaCount CD4<sup>NOW</sup>**

- **Pima CD4 (Alere)**

Le Pima CD4 (Figure 16) est la première technique CD4 POC utilisant aussi bien le sang veineux et le sang capillaire. C'est un appareil portable, simple plateforme, doté d'une batterie interne et basé sur le principe de cytométrie en image. Il utilise des cassettes jetables contenant des anticorps monoclonaux lyophilisés, éliminant le besoin de la chaîne de froid. Le sang veineux est introduit avec une pipette tandis que le sang capillaire est directement recueilli dans la cassette. Une fois le sang dans la cassette, cette dernière doit être insérée immédiatement dans l'analyseur Pima. Tout le processus de marquage et d'incubation se déroule à l'intérieur de la cassette. L'appareil prend des images, fournit le résultat dans les 20 minutes et est doté d'une mémoire interne lui permettant d'archiver jusqu'à 1000 résultats. Lesquels résultats peuvent être exportés sur clef USB ou par connectivité wifi ou par câble Ethernet. L'appareil peut analyser jusqu'à 20 échantillons/jour. Plusieurs études ont montré une bonne concordance entre Pima CD4 et les techniques de référence (FACSCalibur & FACSCount) avec généralement une meilleure performance pour le sang veineux comparé au sang capillaire. En définitive, le Pima CD4 est convenable pour l'identification des adultes éligibles au traitement dans les zones à ressources limitées [22, 61, 92, 62].



**Figure 16 : Pima CD4**

- **CyFlow miniPOC (Partec – Sysmex)**

Le CyFlow miniPOC est un appareil portable, basé sur le principe de la cytométrie en flux et qui fournit le taux de lymphocytes T CD4 en valeur absolue et en pourcentage (Figure 17). Le CyFlow miniPOC fonctionne avec le kit « Partec CyFlow miniPOC CD4% » constitué

d'anticorps monoclonaux lyophilisés éliminant ainsi tout besoin d'une chaîne de froid et des consommables nécessaires à la réalisation du test. Le CyFlow miniPOC peut analyser 60 échantillons/jour tandis que la compagnie réclame un débit journalier de 250 échantillons/jour. A l'image des autres cytomètres en flux, le CyFlow miniPOC présente une excellente précision, et il montre une bonne concordance avec le FACSCalibur et le FACSCount CD4. Le CyFlow miniPOC est adapté au suivi des adultes et enfants infectés par le VIH dans les pays à faible revenu et peut être utilisé soit dans le centre ou dans laboratoires périphériques [63, 74, 83, 103].



**Figure 17 : CyFlow miniPOC**

- **MBio CD4 (MBio Diagnostics)**

Le MBio CD4 est un appareil portable simple plateforme, doté d'une batterie interne et basé sur le principe de cytométrie à image. Le MBio CD4 système combine des cassettes jetables et un lecteur simple. Il utilise aussi bien le sang veineux que le sang capillaire. Le sang est introduit directement dans la cassette qui contient des anticorps monoclonaux lyophilisés, éliminant tout besoin de chaîne de froid. A la différence du Pima CD4, les cassettes sont incubées sur le rack pendant 20 minutes en dehors du lecteur (Figure 18), offrant ainsi la possibilité de préparer les échantillons par lots. Le MBio CD4 a un débit journalier de 80 échantillons. Le système a une mémoire interne et offre la possibilité d'exporter les résultats sur clef USB ou par connectivité wifi ou par câble Ethernet. Les taux absolus de CD4 fournis par le MBio montrent une bonne concordance avec ceux fournis par le FACSCalibur aussi bien avec le sang veineux qu'avec le sang capillaire [36, 83, 99]. Le MBio CD4 n'est pas encore sur le marché.



**Figure 18 : MBio CD4 system**

- **FACSPresto (BD Biosciences)**

Le FACSPresto est un appareil portable simple plateforme, doté d'une batterie interne et basé sur le principe de cytométrie à image avec le système volumétrique. Il fournit le taux de CD4 et le CD4% ainsi que le taux d'hémoglobine à partir d'une même cassette jetable (Figure 19). Il utilise aussi bien le sang veineux que le sang capillaire. La cassette contient des anticorps monoclonaux (CD4-PE-Cy5, CD3-APC, CD45RA-APC et CD14 PE) lyophilisés éliminant ainsi tout besoin d'une chaîne de froid. L'entreprise réclame que l'instrument peut être manipulé dans des conditions environnementales extrêmes, sans entretien préventif ou de routine pour le fonctionnement quotidien sur le terrain. L'incubation dure 18 min et a lieu sur un rack, permettant la préparation d'échantillons par lot. L'appareil a un débit de 60 échantillons par jour. Le système FACSPresto est doté d'une mémoire interne pour stocker les résultats. Pour assurer la qualité des résultats, un contrôle qualité interne des réactifs et de l'appareil est effectué pour chaque analyse [11, 36, 99]. Le FACSPresto a reçu la préqualification de l'OMS en Septembre 2014 [107]. Actuellement, il est en phase d'évaluation et aucune donnée de performance n'a été publiée à ce jour.



**Figure 19: FACSPresto**

**Tableau III : Description comparative des technologies CD4 POC**

Technologie	Principe	Type de Sang	Volume de sang	Paramètres	Durée	Capacité journalière	Besoin chaine de froid	Connectivité
<b>HumaCount CD4<sup>now</sup></b>	Cytométrie en Flux	Veineux	40µl	CD4, CD4%, Hb & NFS	8min	40 – 50 tests	Non	Oui
<b>Pima CD4</b>	Cytométrie à Image	Veineux & Capillaire	25µl	CD4	20min	15 – 20 tests	Non	Oui
<b>CyFlow miniPOC</b>	Cytométrie en Flux	Veineux	20µl	CD4 & CD4%	20min	60 tests	Non	Non
<b>MBio CD4</b>	Cytométrie à Image	Veineux & Capillaire	15µl	CD4	23min	80 tests	Non	Non
<b>FACSPresto</b>	Cytométrie à Image	Veineux & Capillaire	25µl	CD4, CD4% & Hb	22min	50 – 60 tests	Non	Non

**Hb** : hémoglobine ; **NFS** : numération Formule Sanguine ; **CD4** : taux absolu de lymphocytes T CD4 ; **CD4%** : pourcentage de lymphocytes T CD4

**Chapitre II :**

**MATERIEL ET METHODES**

## **II. Matériel et méthodes**

### **II.1. Matériels et réactifs**

- FACSCalibur avec le logiciel « CellQuest Pro »
- Tubes TRUCount (Becton Dickinson)
- Anticorps monoclonaux
  - anti-CD45-PerCP (BD Biosciences)
  - anti-CD4-PE (BD Biosciences)
  - anti-CD3-FITC (BD Biosciences)
- Solution de lyse (BD Biosciences).
- FACSPresto (BD Biosciences)
- Cassettes BD FACSPresto CD4%CD4/Hb (BD Biosciences)
- FACSCount (Becton Dickinson)
- Réactifs FACSCount (Becton Dickinson)
- Billes de contrôle FACSCount (Becton Dickinson)
- Rack pour incubation des cassettes du FACSPresto
- Vortex
- FACSFlow
- Eau distillée
- FACSClean
- FACSrinse

### **II.2. Méthodologie**

#### **II.2.1. Cadre d'étude**

L'étude s'est déroulée à l'unité l'Immunologie du Laboratoire de Bactériologie Virologie du Centre Hospitalier National Universitaire (CHNU) Le Dantec. Les échantillons, constitués de prélèvements de sang total, provenaient du Centre de Traitements Ambulatoires (CTA) et du Centre de Recherche et de Formation Clinique (CRCF) du CHNU Fann, de l'Institut d'Hygiène Sociale (IHS) et du CHNU Le Dantec.

#### **II.2.2. Population d'étude**

Notre population d'étude est constituée de 192 enfants et adultes infectés par le VIH venus pour le comptage des lymphocytes T CD4 dans le cadre du suivi biologique de routine. Les

prélèvements de sang (5 ml) sont recueillis dans des tubes contenant de l'EDTA comme anticoagulant.

### **II.2.3. Numération des lymphocytes T CD4 par cytométrie en flux : FACSCalibur**

#### **➤ Principe de la cytométrie en flux**

La cytométrie en flux est une technique d'analyse multiparamétrique sur plusieurs milliers de cellules isolées. Les mesures simultanées de caractéristiques physiques et biologiques des cellules sont effectuées isolément sur chacune d'entre-elles lorsque, entraînées par un fluide au centre d'une veine liquide, les cellules traversent le faisceau laser. Après intersection du rayon incident, la cellule diffracte la lumière. L'intensité de la lumière diffractée dans l'axe (angle  $< 12^\circ$ ) est proportionnelle à la taille de la cellule (FSC : forward scatter) et celle diffractée à  $90^\circ$  est relative à son contenu cytoplasmique (SSC : side scatter). Les signaux détectés par le système optique sont amplifiés, convertis en signaux électroniques puis en valeurs numériques au niveau des photomultiplicateurs (PMT). Elles sont analysées grâce à l'unité informatique du cytomètre. L'affichage simultané des paramètres, FSC, SSC traités par le logiciel, visualise chaque cellule sur écran sous forme de point. C'est le cytogramme, nuage de signaux punctiformes qui apparaît. Selon les deux paramètres, il est possible de distinguer différentes populations cellulaires et de tracer le contour de la population à étudier en excluant d'une part les débris sur les critères de petite taille (FSC) et petite granularité (SSC) et d'autre part les agrégats situés très haut dans la partie supérieure de l'écran. La zone d'intérêt ainsi délimitée (appelée gate ou fenêtre ou région) est la population cellulaire homogène. Seules les valeurs concernant cette région sont analysées par l'emploi du logiciel. D'autres paires de signaux comme FSC et Fluorescence peuvent être considérées, de nouveaux points apparaissent représentant chacun une cellule en fonction de sa taille et de la fluorescence qui lui est associée.

#### **➤ Mode opératoire**

Il est recommandé de préparer un cocktail d'anticorps monoclonaux à l'avance dans un tube Eppendorf stérile de 1,5ml (ce cocktail peut être conservé jusqu'à 3mois à  $4^\circ\text{C}$ ).

**Tableau IV** : Composition du cocktail

Anticorps	Volume (µl) /tube	Volume (µl) /cocktail
CD45-PerCP	2,5	50
CD4-PE	2,5	50
CD3-FITC	2,5	50
<b>Volume total</b>	<b>7,5</b>	<b>150</b>

Pour la numération des lymphocytes T CD4 avec le FACSCalibur, on met 7,5µl du cocktail d'anticorps monoclonaux (CD45-PerCP/CD3-FITC/CD4-PE) dans un tube TRUCOUNT bien étiqueté avec le code du patient. Puis, on y ajoute 50 µl de sang total du patient. Les tubes sont agités au vortex pour homogénéisation, puis incubés 15 minutes à l'obscurité et à température ambiante (TA). Après incubation, on y ajoute 450 µl de solution de lyse. Les tubes sont ensuite passés au vortex puis incubés 10 à 15 minutes à l'obscurité et à TA jusqu'à la lyse totale des hématies. Les tubes sont prêts pour la lecture avec le FACSCalibur.

➤ **Lecture des échantillons avec le FACSCalibur**

- D'abord allumer le FACSCalibur conformément aux procédures de mise en marche de l'appareil,
- Allumer l'ordinateur,
- Ouvrir le programme « CellQuest Pro »
- Aller à "File" → Open document
- Aller à Data 1 → Chris ITM → Trucount → Truc acquisition → ouvrir,
- Aller à Acquire → Connect to Cytometer
- Aller à Acquire → Counter
- Dans la fenêtre « Acquisition » cliquer sur Change (Directory) → cliquer sur Etude Presto Data → Choose
- Cliquer ensuite sur Change (File) : saisir le nom du fichier, et le numéro de "File count" → OK
- Désactiver "Set up"
- Mettre l'appareil en position "Run" et "HI"
- Agiter l'échantillon au vortex et placer le tube sous l'aiguille d'aspiration du FACSCalibur
- Cliquer sur "Acquire"

➤ **Analyse des résultats avec CellQuest Pro**

- Ouvrir le programme CellQuest-Pro,
- Aller à "File" → Open document,
- Aller à Data 1 → Chris ITM →TRUCount→ Truc analyse CD4→ Open Template CD3/CD4/CD45
- Charger l'échantillon, ajuster la région R6
- Enregistrer le fichier en format PDF et fermer le Template.

**II.2.4. Numération des lymphocytes T CD4 par le FACSCount**

➤ **Principe**

Le principe repose sur l'identification des antigènes cellulaires qui ont été préalablement mis en contact avec des anticorps monoclonaux couplés à un fluorochrome et excités par un laser. L'identification est réalisée selon les caractéristiques d'émission des lumières par les cellules. En effet, après introduction de l'échantillon, les cellules marquées sont entraînées dans un fin tube par le liquide de gaine (le *FACSFlow*) qui les contraint à défiler une par une devant un faisceau laser émettant une lumière d'excitation bleu-vert (laser Argon 488 nm). Les informations issues de cette interaction sont recueillies par des filtres qui les transmettent à des photodiodes et des photomultiplicateurs (PMT) qui les transforment en signaux électriques. Enfin, ces signaux électriques sont analysés par des intégrateurs couplés à un logiciel informatique qui les convertissent en valeurs numériques. Les résultats sont donnés sous la forme de valeurs absolues des lymphocytes T CD3, T CD4 et T CD8 ainsi que le rapport CD4/CD8.

➤ **Mode opératoire**

Après avoir inscrit le numéro d'identification du patient sur l'étiquette du réactif, la paire de tubes est passée au vortex d'abord en position renversée puis en position droite pour bien resuspendre les billes, ensuite les tubes sont ouverts à l'aide de la station de perçage. 50µl de sang bien homogénéisé sont ajoutés dans chaque tube. Les tubes sont rebouchés, passés au vortex en position droite avant de les incubier pendant une heure à l'obscurité et à température ambiante (TA). Après incubation, 50µl de Paraformaldéhyde (solution de fixation) sont ajoutés dans chaque tube. Les tubes sont rebouchés et passés au vortex. L'échantillon est ainsi prêt pour l'analyse au FACSCount.

➤ **Lecture des échantillons sur FACSCount**

- Appuyer sur la touche SAMPLE de l'écran FACSCount.
- Entrer le numéro de lot du réactif et les valeurs des billes CD4 et CD8.
- Appuyer CONFIRM.
- Entrer le numéro d'identification du patient.
- Passer la paire de tubes contenant les réactifs au vortex, en position droite, pendant 5 secondes.
- Déboucher le tube CD4 et placer la paire de tubes de réactifs dans le porte-échantillons, le tube CD4 étant en position d'analyse.
- Appuyer sur la touche RUN.
- Sortir la paire de tubes et reboucher le tube CD4. Déboucher le tube CD8 et remettre la paire de tubes dans le porte-échantillons, le tube CD8 étant en position d'analyse.
- Appuyer sur la touche RUN.

Après la lecture du tube CD8, l'appareil imprime directement les résultats obtenus. En même temps on peut sortir la paire de tubes et reboucher le tube CD8. Jeter la paire de tubes de réactifs dans un récipient convenant au matériel biologique potentiellement dangereux.

**II.2.5. Numération des lymphocytes T CD4 par le FACSPresto**

➤ **Principe**

Le FACSPresto est une nouvelle plateforme pour la numération des lymphocytes T CD4, intuitive et conviviale, répondant aux besoins spécifiques d'une utilisation sur le lieu de soin dans les régions à ressources limitées et surtout dans les zones difficiles d'accès. Le réactif, présent dans les cartouches, est constitué d'anticorps monoclonaux CD4-PE-Cy5, CD3-APC, CD45RA-APC et CD14-PE lyophilisés. Lorsque le sang entre en contact avec le réactif, les anticorps monoclonaux se fixent à la surface des lymphocytes et des monocytes. Après incubation, la cartouche est introduite dans l'appareil où le logiciel procède à l'analyse des cellules intéressées. Le FACSPresto fournit la valeur absolue et le pourcentage des lymphocytes T CD4 ainsi que la concentration d'hémoglobine (Hb) à partir d'un échantillon de sang veineux ou capillaire, permettant de déterminer le statut immunitaire des patients atteints du VIH/SIDA et d'en assurer le suivi.

➤ **Mode opératoire**

Le protocole d'analyse commence par la collecte de sang à partir d'une piqûre au doigt ou d'un prélèvement veineux ; le sang est ensuite transféré dans une cartouche jetable à usage unique. Pour augmenter le nombre potentiel de tests journaliers, les cartouches sont incubées en dehors de l'instrument pendant 18 minutes. Après incubation, chaque cartouche est insérée dans le système BD FACSPresto et les résultats sont disponibles en moins de 4 minutes. Pour assurer la qualité et la cohérence des résultats, un contrôle qualité des réactifs et de l'appareil est effectué pour chaque analyse.

➤ **Lecture échantillon**

Aller à lecture échantillon → entrée code patient → valider → choisir opérateur → valider. Il s'en suit la sortie du chariot dans lequel sera placée la cartouche. Après lecture, le résultat est stocké et imprimé automatiquement.

### **II.2.6. Détermination des paramètres de la précision**

La précision du FACSPresto a été évaluée en déterminant les variabilités intra essai et inter essai. Elle a été mesurée en prenant trois échantillons : un échantillon avec un taux de CD4 faible (< 200), un échantillon avec un taux de CD4 moyen (350 – 500) et un échantillon avec un taux de CD4 élevé (> 500). La variabilité intra-essai, qui mesure la variabilité d'une préparation à l'autre incluant aussi l'erreur due à l'opérateur, est déterminée en répétant 10 fois l'analyse de chacun de ces trois échantillons. Pour ce qui est de la variabilité inter essai mesurant la variabilité d'un jour à l'autre, chacun des 3 échantillons est analysé trois fois : dans les 6h (J0) puis à 24h (J1) et dans les 48h (J2) après collecte du sang. Le pourcentage de coefficient de variation est calculé pour chacun de ces paramètres. Une précision est acceptable si :

- le  $CV \leq 15\%$  (ou écart-type  $\leq 35$  CD4/ $\mu$ l) pour des taux de CD4 bas (CD4  $\leq 200$ )
- le  $CV \leq 10\%$  pour des taux de CD4 moyen ou élevé (CD4 > 200)

### **II.2.7. Analyses statistiques**

Les données ont été saisies grâce au tableur Excel et analysées grâce à la version 10.0.2.0 du logiciel MedCalc et à la version 16 du logiciel SPSS. La précision est exprimée en pourcentage de coefficient de variation (CV) obtenu en multipliant par 100 l'écart-type et en le

divisant par la moyenne  $\frac{\text{écart-type} * 100}{\text{moyenne}}$ .

La régression entre les résultats du FACSPresto et ceux du système de référence (FACSCalibur ou FACSCount), a été déterminée par la méthode de Passing-Bablok. La régression de Passing-Bablok est une méthode non paramétrique moins sensible aux outliers et à la distribution des données (**Passing et Bablok, 1983**). La concordance entre les résultats du FACSPresto et ceux du FACSCalibur ou du FACSCount a été évaluée par le coefficient de corrélation de concordance ( $\rho_c$ ), l'analyse de Pollock (CD4 absolu) ou de Bland-Altman (CD4%), le calcul de la similarité et par la détermination de la sensibilité et de la spécificité aux différents seuils. Le coefficient de corrélation de concordance ( $\rho_c = \rho * C_b$ ) mesure la justesse de la relation entre les deux méthodes. Il mesure le degré auquel les paires d'observations tombent sur la droite d'égalité ( $y = x$ ). Dans cette équation, le coefficient de corrélation de Pearson ( $\rho$ ) est considéré comme un paramètre de substitution de la précision, alors que le facteur de correction du biais ( $C_b$ ) est un marqueur de substitution de la justesse (**Lin, 1989**). La méthode Bland-Altman examine, dans un modèle discriminatif, si deux techniques sont suffisamment équivalentes pour être interchangeables. L'approche Bland-Altman consiste à comparer les deux limites d'agrément avec une différence cliniquement acceptable entre deux méthodes. Le biais ou la différence mesurée entre les valeurs générées par les deux techniques est représentée sur l'axe des ordonnées et la moyenne des valeurs générées par les deux méthodes sur l'axe des abscisses. De plus, le biais moyen entre les deux méthodes et les deux limites d'agrément (*limits of agreement* ou LOA = biais  $\pm$  1,96 \* écart-type) sont également représentés sur ce graphe. Dans la méthode de Pollock, les différences sur l'axe des ordonnées sont exprimées en pourcentage relatif de la valeur moyenne (biais \* 100 / moyenne); c'est une modification de la méthode Bland-Altman qui permet d'exprimer la différence en valeur relative plutôt qu'en valeur absolue (**Bland et Altman, 1986 ; Pollock et al., 1992**). La similarité est calculée pour chaque échantillon par la formule : Similarité = (*Moyenne des deux techniques* \* 100)/Référence. La similarité moyenne est une mesure de la justesse et l'écart-type relatif (ETR) peut être considéré comme une mesure de la précision. Plus la moyenne est proche de 100%, plus la technique est juste ; et plus l'écart-type relatif est faible, plus la technique est précise (**Scott et al., 2003**). La sensibilité et la spécificité sont calculées au seuil de mise sous traitement ARV (200, 350 & 500 cellules/ $\mu$ l).

**Chapitre III :**  
**RESULTATS & DISCUSSION**

### **III.1 Résultats**

#### **III.1.1 Caractéristiques de la population d'étude**

Notre population d'étude est constituée de 192 enfants et adultes infectés par le VIH avec un âge médian (min – max) de 42 ans (2 – 73) avec seulement 10 enfants de moins de 15 ans et un sexe ratio de 0,44 (59/133). Les patients sous traitement ARV représentaient 96,9% et la médiane (IQR) du taux de CD4 était de 407 (238,50 – 623,25) cellules/mm<sup>3</sup>. Notre population d'étude est constituée de 37 sujets ayant un taux de CD4 faible (< 200 cellules/mm<sup>3</sup>), 82 ayant un taux de CD4 moyen (= 200 – 500 cellules/mm<sup>3</sup>) et 73 avec un taux de CD4 élevé (> 500 cellules/mm<sup>3</sup>). Seuls 4 sujets étaient infectés par le VIH-2, les 188 restants étant infectés par le VIH-1.

#### **III.1.2 Précision du FACSPresto**

Pour évaluer la précision du Facspresto, nous avons sélectionné trois échantillons, un échantillon avec un taux de CD4 < 200 cellules/mm<sup>3</sup>, un échantillon dont le taux de CD4 est compris entre 350 - 500 cellules/mm<sup>3</sup> et un échantillon avec un taux de CD4 > 500 cellules/mm<sup>3</sup>.

Le tableau V résume les variabilités du FACSPresto pour les trois échantillons. Ainsi, l'évaluation de la variabilité intra essai du FACSPresto montre un CV moyen de 4,68% et 3,65% respectivement pour le taux de CD4 et le pourcentage de CD4 (CD4%). Elle montre également pour la variabilité inter essai, un CV moyen de 6,37% pour le taux de CD4 et un CV moyen de 1,01% pour les CD4%.

**Tableau V : Variabilité du FACSPresto**

		<b>CD4 &lt; 200</b>	<b>CD4 = 350 – 500</b>	<b>CD4 &gt; 500</b>
Variabilité intra essai (n = 10)	CV (CD4)	6,46%	3,91%	3,68%
	CV (CD4%)	5,51	2,76%	2,67%
Variabilité inter essai (n = 3)	CV (CD4)	5,82%	9,52%	3,76%
	CV (CD4%)	2,40%	0,17%	0,45%

*n = nombre de lectures ; CD4 = taux absolu de lymphocytes T CD4 ; CD4% = pourcentage de lymphocytes T CD4 ; CV = Coefficient de Variation*

### III.1.3 Comparaison entre le FACSPresto et la technique de référence, le FACSCalibur

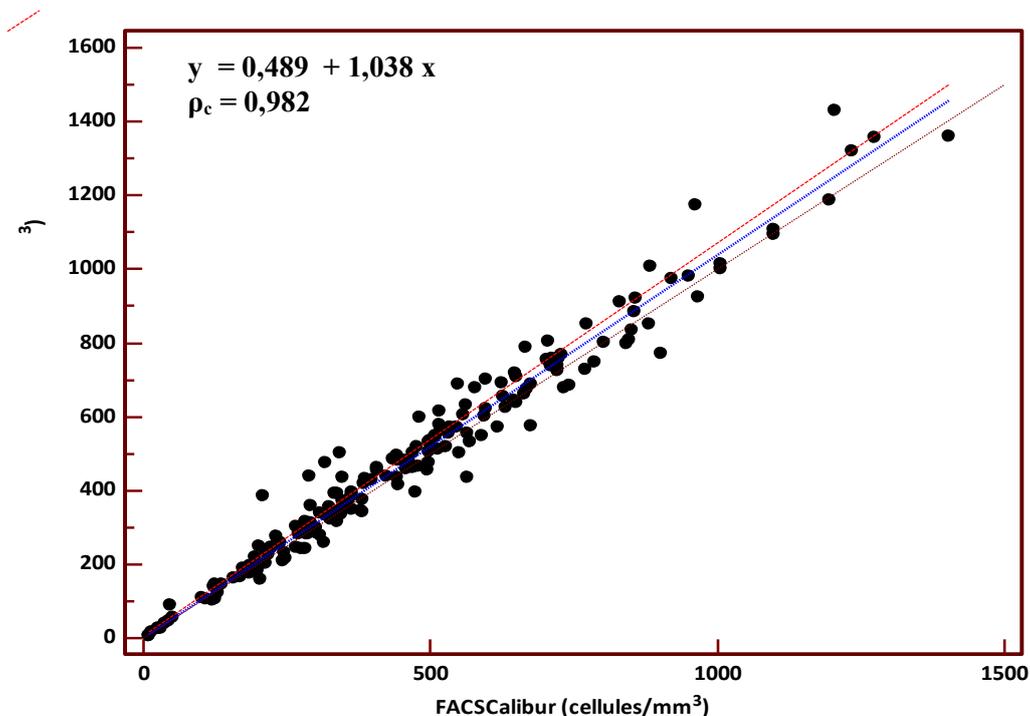
#### ✚ Taux de lymphocytes T CD4

La régression de Passing-Bablok entre FACSCalibur et FACSPresto a montré une pente de 1,038 et un intercept de 0,489 (Figure 19). La comparaison entre FACSCalibur et FACSPresto a donné un coefficient de corrélation de concordance de 0,982. Comparé au FACSCalibur, le FACSPresto a présenté un faible biais relatif moyen de 3,6% avec des limites d'agrément allant de -20,8% à +27,9% (Figure 20) et une similarité moyenne de 102,4% avec un écart-type de 8% (Figure 21), indiquant une faible surestimation des taux de CD4.

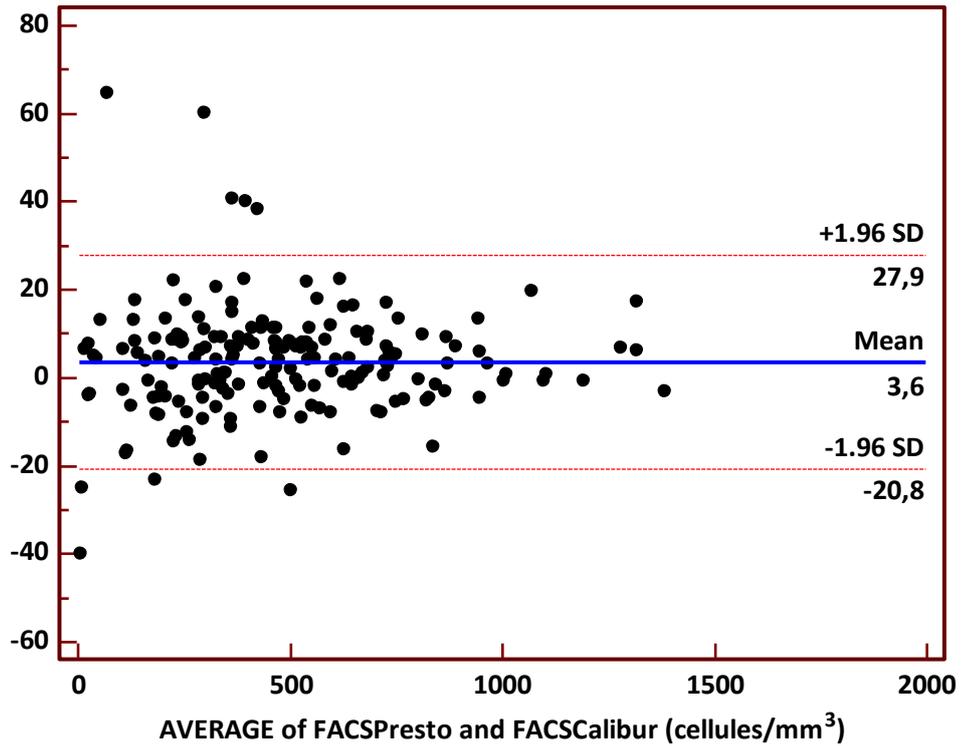
Au seuil de 200, seuls 2 patients (1%) ont été mal classifiés par le FACSPresto dont un qui aurait été précocement traité et un qui aurait un traitement retardé. Le FACSPresto présente une sensibilité de 96,6% et une spécificité de 99,4%.

Au seuil de 350, 13 patients (7%) sont mal classifiés par le FACSPresto qui présente ainsi une sensibilité de 87,0% et une spécificité de 97,2%. Parmi ces 13 mal classifiés, 10 auraient un retard dans l'initiation du traitement en se basant sur le FACSPresto.

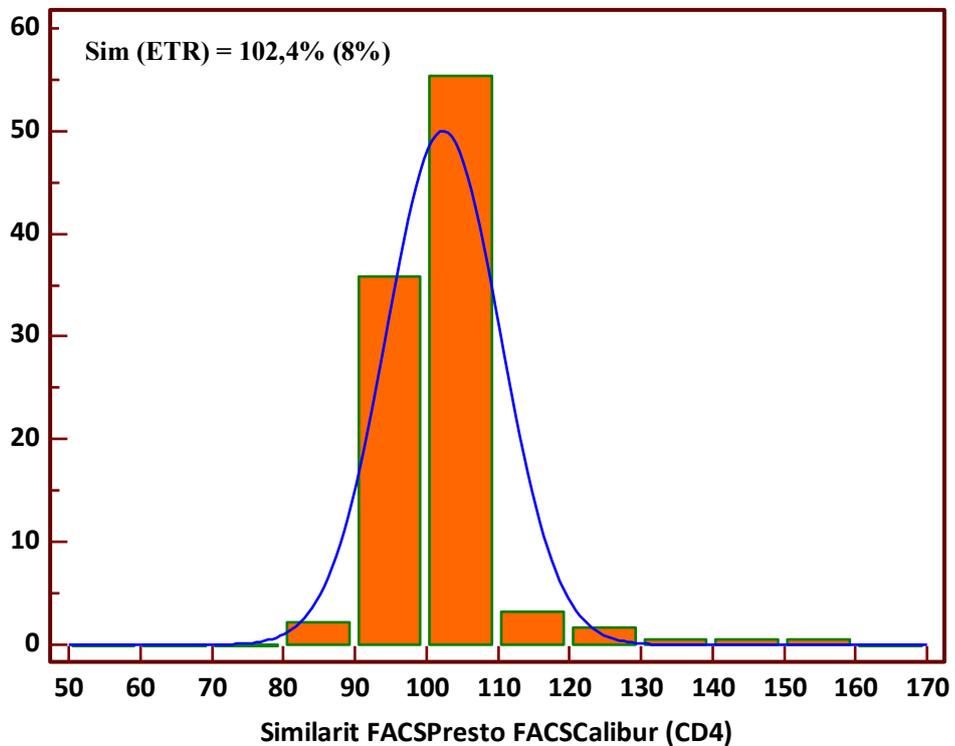
Au seuil de 500 cellules/ $\mu\text{l}$ , 8 patients (4%) ont été mal classifiés par le FACSPresto. Parmi eux, seul un aurait l'initiation de son traitement retardée alors que les autres bénéficieraient d'un traitement précoce si leur suivi est effectué par le FACSPresto. Ainsi, la sensibilité et la spécificité du FACSPresto sont respectivement de 93,8% et 98,6%.



**Figure 20** : Passing-Bablok des taux de CD4 entre FACSPresto et FACSCalibur



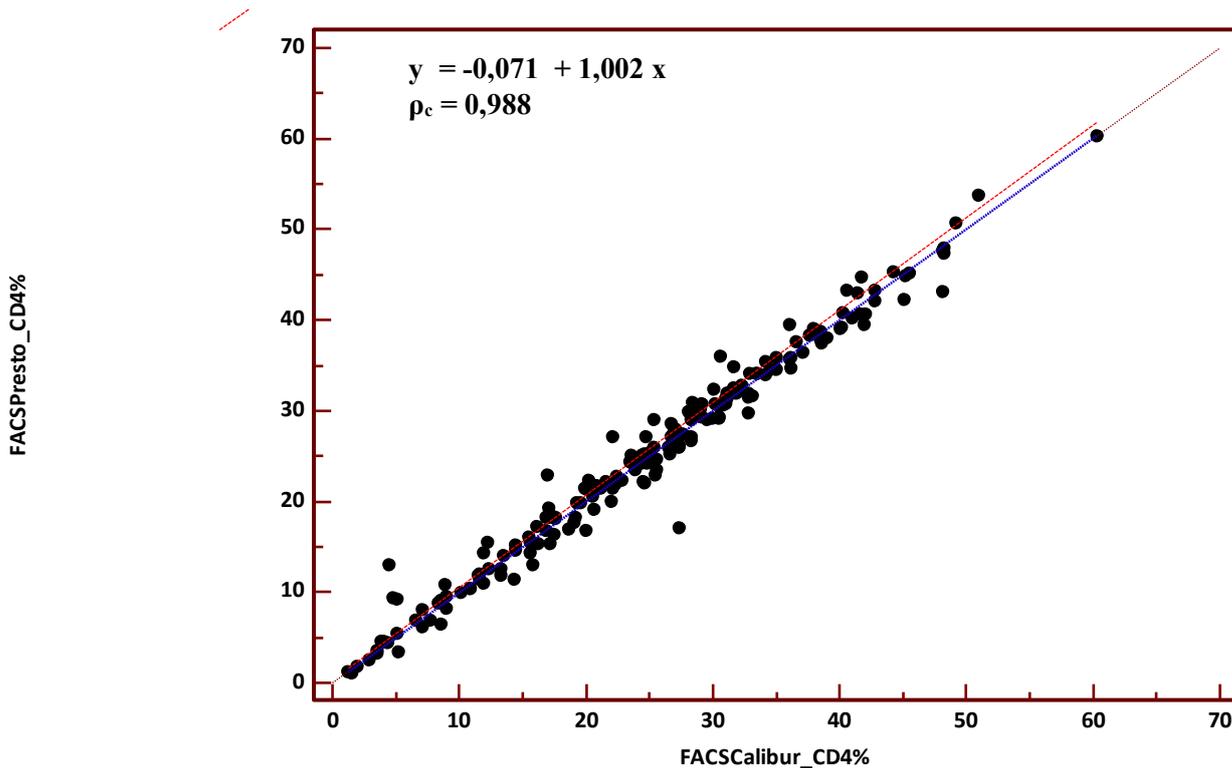
**Figure 21** : Pollock des taux de CD4 entre FACSPresto et FACSCalibur



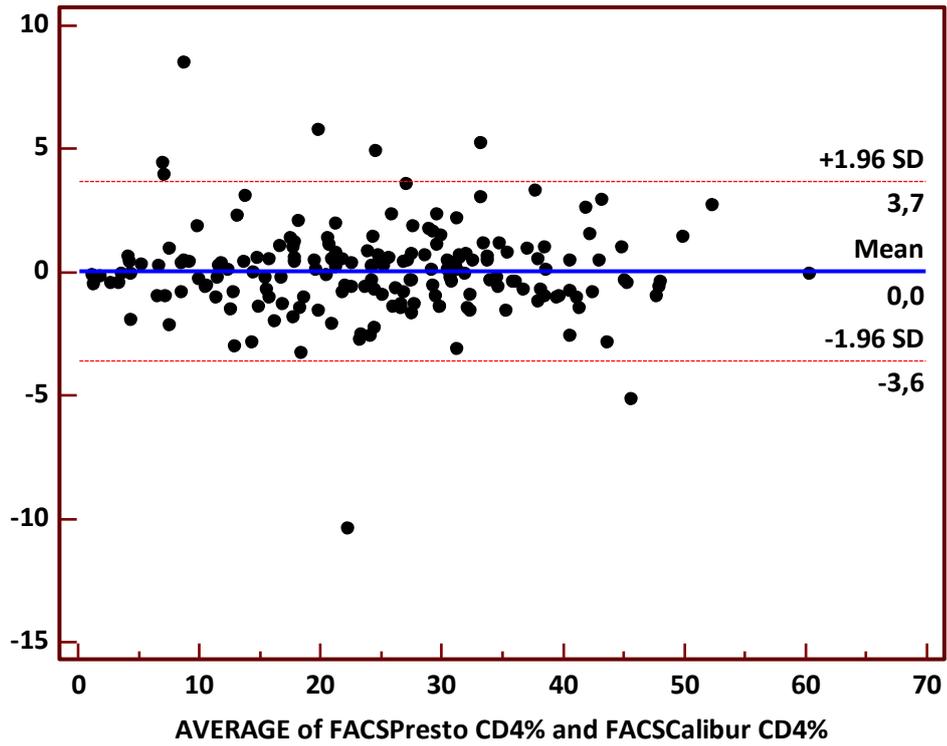
**Figure 22** : Similarité des taux de CD4 entre FACSPresto et FACSCalibur

### Pourcentage de lymphocytes T CD4

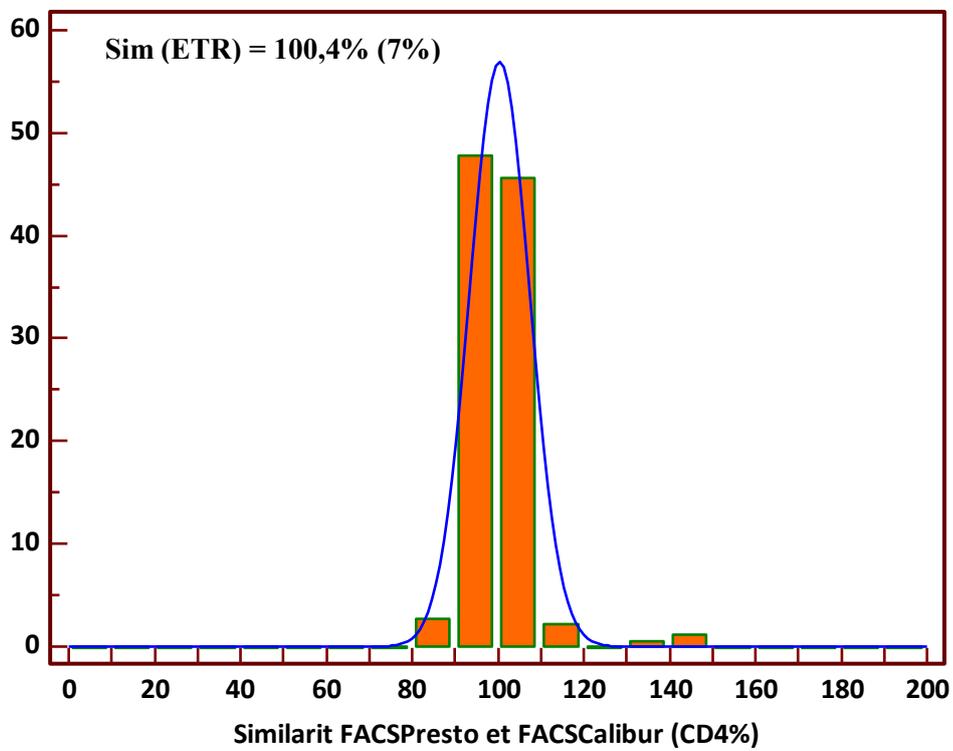
Pour les CD4 %, la régression de Passing-Bablok entre FACSCalibur et FACSPresto a montré une pente de 1,002 et très peu de valeurs présentant de grande discordance. Le FACSPresto présente à l'égard du FACSCalibur un coefficient de corrélation de concordance de 0,988 (figure 22). La comparaison du FACSPresto au FACSCalibur a montré une bonne concordance avec un biais nul et des limites d'agrément (LOA) étroites allant de -3,6% à +3,7% (Figure 23) ainsi qu'une très bonne similarité de 100,4% avec un écart-type relatif de 7% (Figure 24).



**Figure 23** : Passing-Bablok des pourcentages de CD4 entre FACSPresto et FACSCalibur



**Figure 24 :** Bland-Altman des pourcentages de CD4 entre FACSPresto et FACSCalibur

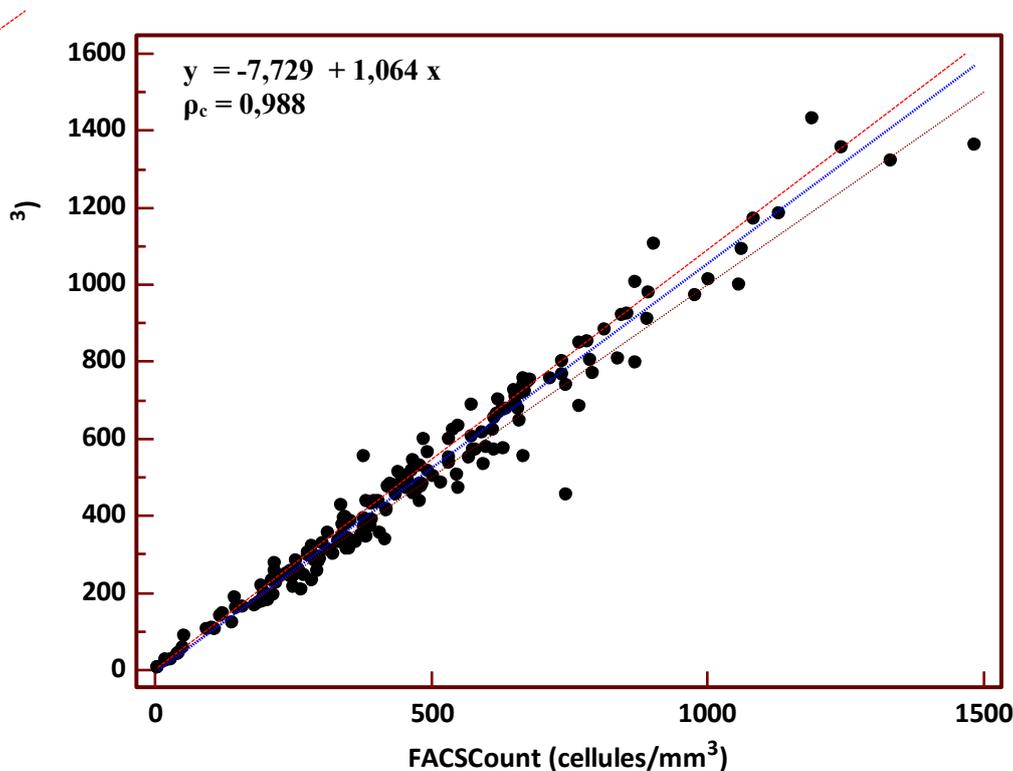


**Figure 25 :** Similarité des pourcentages de CD4 entre FACSPresto et FACSCalibur

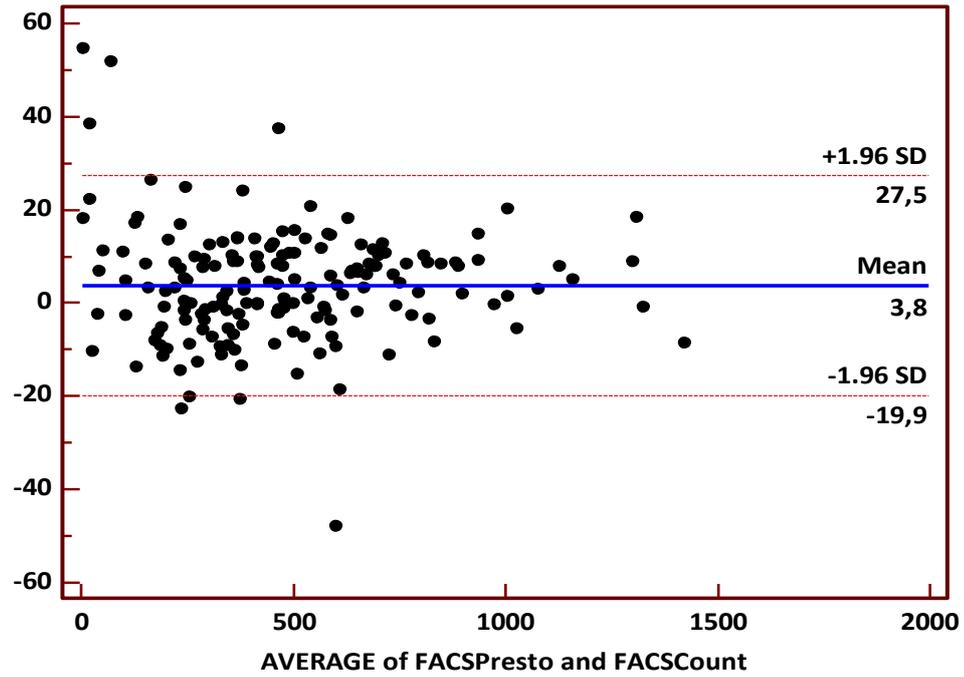
### III.1.4. Comparaison entre le FACSPresto et le FACSCCount sur les taux de CD4

La comparaison des taux de CD4 entre FACSCCount et FACSPresto a montré une pente de 1,064 et un intercept proche de -8 cellules/mm<sup>3</sup> (Figure 25) avec un coefficient de corrélation de concordance de 0,979. Comparé au FACSCCount, le FACSPresto a surestimé faiblement avec un biais relatif moyen de 3,8% avec des limites d'agrément (LOA) allant de -19,9% à 27,5% (Figure 26) et une similarité moyenne de 102,3% (Figure 27).

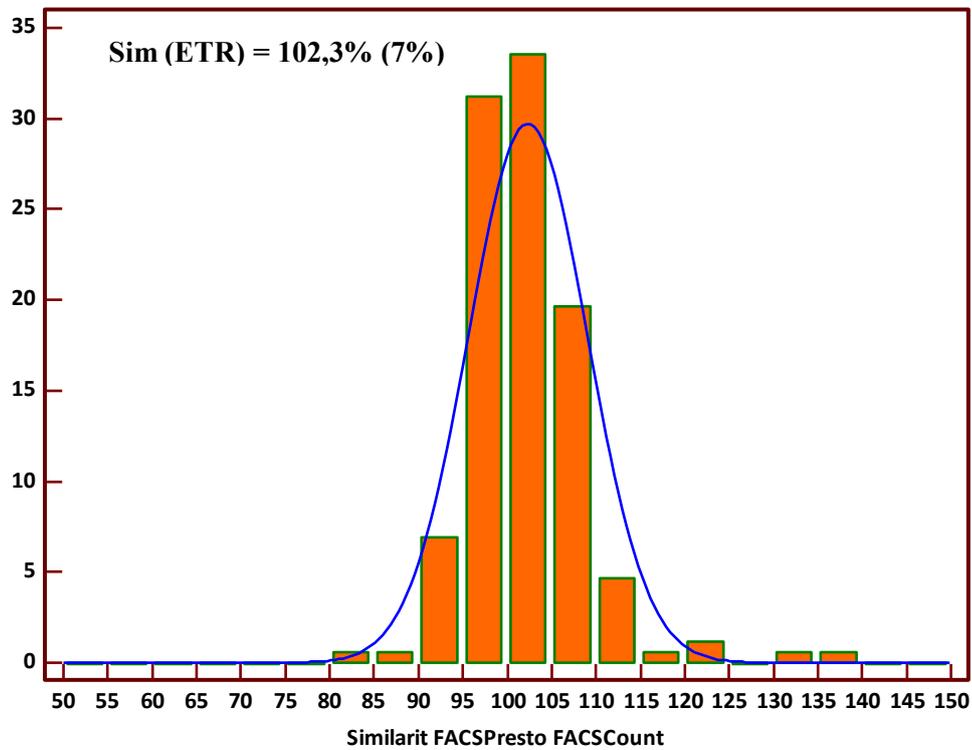
Au seuil de 500 cellules/μl, 11 (soit 6,5%) patients ont été mal classifiés par le FACSPresto par rapport au FACSCCount, et parmi eux, seuls 2 patients auront leur traitement retardé. Ce qui fait que la sensibilité du FACSPresto était de 91,5% pour une spécificité de 96,9% par rapport au FACSCCount.



**Figure 26** : Passing-Bablok des taux de CD4 entre FACSPresto et FACSCCount



**Figure 27** : Pollock des taux de CD4 entre FACSPresto et FACSCCount



**Figure 28** : Similarité des taux de CD4 entre FACSPresto et FACSCCount

### **III.2 Discussion**

Le suivi des personnes vivant avec le VIH se fait le plus souvent avec la quantification de la charge virale et la numération des lymphocytes T CD4. Bien que les dernières recommandations de l'OMS privilégient l'usage de la charge virale pour le suivi des patients sous traitement ARV, c'est la numération des lymphocytes T CD4 qui demeure le plus commun pour l'initiation et le suivi du traitement ARV du fait de la relative inaccessibilité de la charge virale dans les pays à ressources limitées [36, 83]. La cytométrie en flux est considérée comme la méthode de référence du fait de sa précision et de la fiabilité des résultats. Cependant, il présente aussi des limites car il n'est pas mobile et ses réactifs coûtent chers et requièrent une chaîne de froid et un personnel hautement qualifié [57].

L'introduction des techniques dites *Point-Of-Care* (POC) tels que le Pima CD4, le CyFlow miniPOC ainsi que le FACSPresto a permis d'accroître l'accès aux ARV dans les pays à ressources limitées [44].

Notre étude est la première à évaluer le FACSPresto, et ce, en le comparant avec le FACSCalibur et le FACSCount, un cytomètre dédié largement répandu dans les pays à faible revenu. Il ressort de cette étude que le FACSPresto présente une bonne précision avec des CV < 7% et une bonne concordance par rapport au FACSCalibur et au FACSCount. Ces résultats sont comparables à ceux trouvés avec le FACSCount CD4 (91 ; 101), le CyFlow Counter [31 ; 102] et Apogee Auto40 [26 ; 58 ; 47], le CyFlow miniPOC [103] mais semblent meilleurs que ceux rapportés sur le Pima CD4 [61, 22, 102]. En plus, le FACSPresto a montré une bonne similarité comparé au FACSCount et au FACSCalibur. Ces valeurs sont similaires à ceux trouvées avec le Pima CD4 [22, 102], le CyFlow Counter [102] et le CyFlow miniPOC [103]. Les taux de mal classification du FACSPresto sont comparables à ceux observés avec le Pima CD4 [101,102] et le CyFlow miniPOC [103].

Le FACSPresto est un cytomètre à image, portable et alimenté par batterie, ce qui le rend convenable aux zones non dotées d'une électricité stable. L'usage du sang capillaire fait qu'il peut être utilisé dans des postes de santé ne disposant pas de personnel qualifié ou simplement être installé dans le bureau même des cliniciens à l'image du Pima CD4 et contrairement au CyFlow miniPOC qui requiert du sang veineux et une électricité stable. Il est basé sur le principe de la cytométrie à image et utilise des cassettes jetables contenant des réactifs lyophilisés. Ce qui contribue à éliminer le besoin d'une chaîne de froid. Il fournit des résultats en valeur absolue et en pourcentage ainsi que le taux d'hémoglobine dans le sang, à partir d'une même cassette [36, 11, 99, 102, 103]. L'entreprise réclame que l'appareil peut être

utilisé dans des conditions environnementales extrêmes, sans un besoin pour l'entretien de routine ou préventif pour le fonctionnement quotidien [11].

# **CONCLUSION**

## **Conclusion**

La numération des lymphocytes T CD4 est un paramètre important dans le suivi des personnes vivant avec le VIH. Il est nécessaire à l'initiation du traitement antirétroviral et permet le suivi de l'efficacité thérapeutique en l'absence de charge virale. Les cytomètres en flux standards tels que le FACSCalibur sont considérés comme techniques de référence par leur précision et leur fiabilité. Cependant ils coûtent relativement chers, exigent un personnel qualifié, une chaîne de froid stable et une maintenance préventive régulière. A côté de ces cytomètres conventionnels, existent les cytomètres dédiés qui malheureusement sont relativement coûteux et exigent eux aussi un personnel qualifié, une électricité stable et de l'air conditionné. Tout récemment, il y a eu l'émergence des technologies Point-Of-Care pour assurer l'élargissement de l'accès au traitement antirétroviral dans les zones les plus reculées. Ces techniques peuvent utiliser le sang capillaire et sont généralement alimentées par une batterie rechargeable (à l'exception du CyFlow miniPOC) et ne nécessitent pas de chaîne de Froid.

Le FACSPresto, qui est une technique POC simple plateforme. Il fournit le taux et le pourcentage des lymphocytes T CD4 en plus du taux d'hémoglobine. Alimenté par une batterie, le FACSPresto est portable et ne nécessite pas de chaîne de froid du fait de l'utilisation de réactifs lyophilisés. Il peut être utilisé aussi bien au laboratoire que dans le bureau des cliniciens avec du sang capillaire.

Notre étude est la première à évaluer le FACSPresto. Globalement, nos résultats ont montré une bonne précision et une bonne concordance du FACSPresto avec les techniques de références pour le comptage des lymphocytes TCD4. Le temps de lecture ne dépasse pas 3 minutes et le résultat est obtenu en 20 minutes environ avec une possibilité de stockage interne et de transfert des données. Le FACSPresto est simple d'utilisation et permet l'initiation de la thérapie antirétrovirale et le suivi des patients sous traitement antirétroviral.

Ainsi, ce système constitue une bonne alternative aux cytomètres standards pour la prise en charge immunologique des adultes et enfants vivant avec le VIH dans les zones à ressources limitées.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abbas, A. K. et A. H. Lichtman (2005).** Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique. Eds Elsevier SAS, 299p.
2. **Alimonti JB1, Ball TB, Fowke KR (2003).** Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *J Gen Virol*.Jul;84(Pt 7):1649-61.
3. **Appay, V., Nixon, D., F. and S. M. Donahoe (2000).** HIV-specific CD8+ T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *The Journal of Experimental Medicine*; 192: 63-75.
4. **Asano M, Toda M, Sakaguchi N et al (1996).** Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T Cell subpopulation. *J Exp Med*; 184(2):387-96.
5. **Autran, B., Carcelain, G., Li, T. S., Blanc, C., Mathez, D., Tubiana, R., Katlama, C., Debré, P. and J. Leibowitch, (1997).** Positive Effects of Combined Antiretroviral Therapy on CD4+ T Cell Homeostasis and Function in Advanced HIV Disease. *Science*; 277 (5322): 112 – 116.
6. **Balakrishnan P, Dunne M, Kumarasamy N, Crowe S, Subbulakshmi G, Ganesh AK, Cecelia AJ, Roth P, Mayer KH, Thyagarajan SP, Solomon S (2004).** An inexpensive, simple, and manual method of CD4 T-cell quantitation in HIV-infected individuals for use in developing countries. *J Acquir Immune Defic Syndr* 36: 1006-1010.
7. **Balbaryski J, Simonte K, Urteneche I, Candi M, Gaddi E, Barboni G (2013).** Antiretroviral treatment adherence and its association with TCD4+ lymphocyte subsets in children with HIV/AIDS. *Medicina (B Aires)*;73(4):324-30.
8. **Barouch, D. H., Kunstman, J. and M. J. Kuroda (2002).** Eventual AIDS vaccine failure in a rhesus monkey by viral escape from cytotoxic T lymphocytes. *Nature*; 415:335-339.
9. **Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet- Brun F, Rouzioux c, Rozenbaum W, Montagnier L.(1983).** Isolation of T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Sciences* 1983; 220(4599): 868-71.
10. **BD Biosciences (2014).** BDFACSCount.  
<http://www.bdbiosciences.com/instruments/facscount/index.jsp>.
11. **BD Biosciences (2014)** BD FACSPrestoTM : A near-patient complete CD4 testing solution. <https://www.bdbiosciences.com/documents/FACSPresto-BR.pdf>.

12. **Belan, A.G., Chaplain, C. et A. Boussairi, (2008).** Suivi biologique de l'infection à VIH chez l'adulte. *Immuno-analyse et Biologie Spécialisée* ; 23(2) : 95-102.
  
13. **Bergeron M, Daneau G, Ding T, Siteo NE, Westerman LE, Stokx J, Jani IV, Coetzee LM, Scott L, De WA, Boel L, Stevens WS, Glencross DK, Peter TF (2012).** Performance of the PointCare NOW system for CD4 counting in HIV patients based on five independent evaluations. *PLoS One* 7: e41166. 10.1371/journal.
  
14. **Brooks JT, Kaplan JE, Masur H (2009).** What's new in the 2009 US Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections among adults and adolescents with HIV. *Top HIV Med*; 17:109-114.
  
15. **Burmester, G.R. et A. Pezzutto, (2000).** Atlas de poche d'Immunologie. Bases, analyses, pathologies. Eds Médecine-Sciences Flammarion. 293 p.
  
16. **Carcelain, G., Tubiana, R., Samri, A., Calvez, V., Delaugerre, C., Agut, H., Katlama, C. and B. Autran, (2001).** Transient Mobilization of Human Immunodeficiency Virus-specific CD4 T-helper cells fails to control virus rebounds during intermittent antiretroviral therapy in chronic HIV type 1 infection. *Journal of Virology*; 75 (1): 234-241.
  
17. **Chaplain, C. et A. G. Belan, (2006).** Suivi biologique de l'infection VIH : intérêts du génotypage pour la résistance et du dosage des antirétroviraux. *Spectra Biologie* ; 25 (151): 42-47.
  
18. **Clavel, F., Guétard, D., Brun-Vézinet, F., Chamaret, S., Rey, M.A., Santos-Ferreira, M.O., Laurent, A.G., Dauguet, C., Katlama, C. and C. Rouzioux, (1986).** Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*, 233(4761):343-346.
19. **Cohen, O. J., Kinter, A. and A. S. Fauci (1997).** Host factors and the pathogenesis of HIV disease. *Immunology Reviews*; 159:31-48.
  
20. **Delfraissy JF(1999).** Mécanismes immunologiques et virologiques impliqués dans l'infection à virus de l'immunodéficience humaine : impact des traitements. *Rev Pratic*. 1999; 49(16): 1740-45.
  
21. **Demarchi IG, Cardoso DM, Aristides SMA, Moliterno RA, Silveira TGV, Cardoso RF, et al (2012).** Activity of antiretroviral drugs in human infections by opportunistic agents. *Braz J Pharm Sci*; 48:171-185.
  
22. **Diaw PA, Daneau G, Coly AA, Ndiaye BP, Wade D, Camara M, Mboup S, Kestens L, Dieye TN (2011).** Multisite Evaluation of a Point-of-Care Instrument for CD4+ T-Cell Enumeration Using Venous and Finger-Prick Blood: The PIMA CD4. *J Acquir Immune Defic Syndr* 58: e103-e111. 10.

- 23. Diaw PA, Sylla NM, Toure KC, Dieye TD, Diop NH, Wade AS, Dieye A, Mboup S (2008).** Decentralization of the immunological monitoring of people living with HIV/AIDS in a limiting setting with a low HIV seroprevalence: the experience of Senegal]. *Ann Biol Clin (Paris)* 66: 409-416.
- 24. Didier JM, Kazatchkine MD, Demouchy C, Moat C, Diagbouga S, Sepulveda C, Di Lonardo AM, Weiss L (2001).** Comparative assessment of five alternative methods for CD4+ T-lymphocyte enumeration for implementation in developing countries. *J Acquir Immune Defic Syndr* 26: 193-195.
- 25. Dieye TN, Vereecken C, Diallo AA, Ondoa P, Diaw PA, Camara M, Karam F, Mboup S, Kestens L (2005).** Absolute CD4 T-cell counting in resource-poor settings: direct volumetric measurements versus bead-based clinical flow cytometry instruments. *J Acquir Immune Defic Syndr* 39: 32-37.
- 26. Dieye TN, Diaw PA, Daneau G, Wade D, Sylla NM, Camara M, Diallo AA, Toure KC, Diop NH, Mbengue B, Dieye A, Kestens L, Mboup S (2011).** Evaluation of a flow cytometry method for CD4 T cell enumeration based on volumetric primary CD4 gating using thermoresistant reagents. *J Immunol Methods* 372: 7-13.
- 27. Fauci AS, Desrosiers RC (1997).** Pathogenesis of HIV and SIV. 1997; *Retroviruses* p 587-636
- 28. Fauci, A, S, (1996).** Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. *Nature*; 384:529-534.
- 29. Fidgor, C. G, van Kooyk, Y. and G. J. Adema (2002).** C-type lectin receptors on dendritic cells and langerhans cells. *Nature Reviews Immunology* ; 2:77-84.
- 30. Fripiat F, Vandercam B, Hubinot C, Petit N, Sperandeo D, Moreau M, Gennotte A. F. et J. A. Gastaut., (1999).** Infection par le virus de l'immunodéficience humaine et grossesse:généralités et considérations thérapeutiques actuelles. *Louvain Médical*. 118: 13-21.
- 31. Fryland M, Chaillet P, Zachariah R, Barnaba A, Bonte L, Andereassen R, Charrondiere S, Teck R, Didakus O (2006)** The Partec CyFlow Counter could provide an option for CD4+ T-cell monitoring in the context of scaling-up antiretroviral treatment at the district level in Malawi. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100: 980-985.
- 32. Furelaud G, Pavie B (2004).** Structure du VIH et de son génome.

- 33. Galisteu KJ, Cardoso LV, Furini AA, Schiesari Júnior A, Cesarino CB, Franco C, Baptista AR, Machado RL (2015).** Opportunistic infections among individuals with HIV-1/AIDS in the highly active antiretroviral therapy era at a Quaternary Level Care Teaching Hospital. *Rev Soc Bras Med Trop*;48(2):149-56.
- 34. Girard, P.M., Katlama, C. et G. Pialoux, (2001).** VIH. Edition Doin ; Paris, 542p.
- 35. Glencross D, Scott LE, Jani IV, Barnett D, Janossy G (2002).** CD45-assisted PanLeucogating for accurate, cost-effective dual-platform CD4<sup>+</sup> T-cell enumeration. *Cytometry* 50: 69-77.
- 36. Glynn MT, Kinahan DJ, Ducree J (2013).** CD4 counting technologies for HIV therapy monitoring in resource-poor settings--state-of-the-art and emerging microtechnologies. *Lab Chip* 13: 2731-2748.
- 37. Gumbo P, Chideme M, Mangwanya D, Handireketi N, Kambarami D, Baudi I, Mtapuri-Zinyowera S (2013).** Analysis of Bias and ART Enrollment for a Point-of-Care CD4/CD4% Analyzer. *Journal of AIDS & Clinical Research* 4: 247-251.
- 38. H.J.A fleury (2002).** Virologie Humaine : connaissance et pratique, masson.
- 39. Haynes, B., F., Pantaleo, G. and A., S. Fauci (1996).** Toward an understanding of the correlates of protective immunity to HIV infection. *Science*; 271:324-328.
- 40. Hazenberg, M., D., Hamann, D., Schuitemaker, H., Miedena F. (2000).** T cell depletion in HIV-1 infection: how CD4<sup>+</sup> T cells go out of stock. *Nat Immunol* ; 1:285-289.
- 41. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M(1995).** Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995; 373(6510): 123-6.
- 42. Hoosen C (2004).** Antiretroviral agents --How best to protect infants from HIV and save their mothers from AIDS. *N Engl J Med.* 2004 ; 351(3): 217-28.
- 43. Hu D. J., Vanichseni, S., Mastro T. D., Raktham , Young N. L., Mock P. A., Subbarao S. et al .,(2001) .** Viral load differences in early infection with two HIV-1 subtypes. *AIDS* . 15 (6): 683-691.

- 44. Human Diagnostics Worldwide (2014).** HumaCount CD4now.  
<http://www.human.de/en/products/hematology/instruments-and-systems/cell-counter.php>  
 Addendum.
- 45. Janeway CA, Jr., Yagi J, Rojo J, Portoles P, Carding S, Luqman M, Bottomly K (1988).** Immune recognition and effector function in subsets of CD4 T cells. Princess Takamatsu Symp 19: 193-208.
- 46. Klatzmann, D., Champagne, E. and S. Chamaret, (1984).** T-lymphocytes T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature*; 312(5996):767-8.
- 47. Koyalta D, Jenabian MA, Nadjiouroum N, Djouater B, Djemadji-Oudjeil N, Ndjoi-Mbiguino A, Belec L (2013).** Single-platform, volumetric, CD45-assisted pan-leucogating flow cytometry for CD4 T lymphocytes monitoring of HIV infection according to the WHO recommendations for resource-constrained settings. *BMC Res Notes* 6: 169.
- 48. Lazrek, M., Lobert, P.E., Goffard, A., Schanen, C., Dewilde, A., Bocket, L., et D. Hober , (2005).** Différentes approches de vaccination thérapeutique dans le traitement de l'infection par le VIH-1. *Annales de Biologie Clinique*. 63(6):581-588.
- 49. Levacher, M., Hulstaert, F., Tallet, F., Ullery, S., Pocidalo. J. and B. Bach, (1992).** The significance of activation markers on CD8 lymphocytes in human immunodeficiency syndrome: staging and prognostic value. *Clin. Exp. Immunol.* ; 90(3):376-82.
- 50. Levy, J. A. (2001).** The importance of the innate immune system in controlling HIV infection and disease. *TRENDS in Immunology*, 22:312-316.
- 51. Levy, Y., (2002).** L'immunothérapie de l'infection par le VIH. *J. Soc. Biol.* ; 196:13-8.
- 52. Liang S., Shen Z., Yan J., Liang F., Tang Z., Liu W., Kan W., Liao L., Leng X., Ruan Y., Xing H., Shao Y. (2015).** Low Virologic Failure and Drug Resistance among HIV-Infected Patients Receiving Hospital-Based ART While Care and Outreach through Community in Guangxi, China. *Front Public Health*. 27;3:244
- 53. Lin LI (1989).** A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics*; 45: 255-268.
- 54. Lopez A, Caragol I, Candeias J, Villamor N, Echaniz P, Ortuno F, Sempere A, Strauss K, Orfao A (1999).** Enumeration of CD4 (+) T-cells in the peripheral blood of HIV-infected patients: an interlaboratory study of the FACSCCount system. *Cytometry* 38: 231-237.

- 55. Lyamuya EF, Kagoma C, Mbeni EC, Urassa WK, Pallangyo K, Mhalu FS, Biberfeld G (1996)** Evaluation of the FACScount, TRAx CD4 and Dynabeads methods for CD4 lymphocyte determination. *J Immunol Methods* 195: 103-112.
- 56. Manasa J, Musabaike H, Masimirembwa C, Burke E, Luthy R, Mudzori J (2007)** Evaluation of the Partec flow cytometer against the BD FACSCalibur system for monitoring immune responses of human immunodeficiency virus-infected patients in Zimbabwe. *Clin Vaccine Immunol* 14: 293-298.
- 57. Mandy F, Janossy G, Bergeron M, Pilon R, Faucher S (2008)** Affordable CD4 T-cell enumeration for resource-limited regions: a status report for 2008. *Cytometry B Clin Cytom* 74 Suppl 1: S27-S39.
- 58. Mbopi-Keou FX, Mion S, Sagnia B, Belec L (2012)** Validation of a single-platform, volumetric, CD45-assisted PanLeucogating Auto40 flow cytometer to determine the absolute number and percentages of CD4 T cells in resource-constrained settings using Cameroonian patients' samples. *Clin Vaccine Immunol* 19: 609-615.
- 59. Mbopi-Keou FX, Sagnia B, Ngogang J, Angwafo FF, III, Colizzi V, Montagnier L, Belec L (2012).** Validation of a single-platform, volumetric, flow cytometry for CD4 T cell count monitoring in therapeutic mobile unit. *J Transl Med* 10: 22. 1479-5876-10-22.
- 60. Mboup S, Diouf O, Gueye-Gaye A, Gueye-Ndiaye A (2009).** Surveillance sentinelle du VIH et de la syphilis chez la femme enceinte. *Bulletin épidémiologique* N°13.
- 61. Mtapuri-Zinyowera S, Chideme M, Mangwanya D, Mugurungi O, Gudukeya S, Hatzold K, Mangwiwo A, Bhattacharya G, Lehe J, Peter T (2010).** Evaluation of the PIMA point-of-care CD4 analyzer in VCT clinics in Zimbabwe. *J Acquir Immune Defic Syndr* 55: 1-7. 10.
- 62. Myer L, Daskilewicz K, McIntyre J, Bekker LG (2013).** Comparison of point-of-care versus laboratory-based CD4 cell enumeration in HIV-positive pregnant women. *J Int AIDS Soc* 16: 18649.
- 63. Nabukeera-Barungi N, Elyanu P, Asire B, Katureebe C, Lukabwe I, Namusoke E, Musinguzi J, Atuyambe L, Tumwesigye N (2015).** Adherence to antiretroviral therapy and retention in care for adolescents living with HIV from 10 districts in Uganda. *BMC Infect Dis* Nov 14;15(1):52.
- 64. Nasi M, De BS, Bianchini E, Gibellini L, Pinti M, Scacchetti T, Trenti T, Borghi V, Mussini C, Cossarizza A (2015).** Reliable and Accurate CD4+ T Cell Count and Percent by the Portable Flow Cytometer CyFlow MiniPOC and "CD4 Easy Count Kit-Dry", as Revealed by the Comparison with the Gold Standard Dual Platform Technology. *PLoS One* 10: e0116848.

- 65. O'Gorman MR, Nicholson JK (2000).** Adoption of single-platform technologies for enumeration of absolute T-lymphocyte subsets in peripheral blood. *Clin Diagn Lab Immunol* 7: 333-335.
- 66. O'Gorman, M.R. and L.S. Zijenah, (2008).** CD4 T cell measurements in the management of antiretroviral therapy--A review with an emphasis on pediatric HIV-infected patients. *Cytometry B Clin Cytom* ; 74 Suppl 1:S19-S26.
- 67. OMS, (2007).** Guide pour la mise à l'échelle au plan mondial de la prévention de la transmission mère-enfant du VIH. [www.who.int/hiv](http://www.who.int/hiv)
- 68. OMS (2015).** VIH/SIDA : Aide mémoire N°360.. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/fr>.
- 69. ONUSIDA (2007).** Le point sur l'épidémie de sida.. [http://data.unaids.org/pub/EPISlides/2007/2007\\_epiupdate\\_fr.pdf](http://data.unaids.org/pub/EPISlides/2007/2007_epiupdate_fr.pdf).
- 70. ONUSIDA (2014).** Rapport d'activité 2014 sur la riposte au sida dans le monde. [http://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/GARPR\\_2014\\_guidelines\\_fr.pdf](http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/GARPR_2014_guidelines_fr.pdf)
- 71. ONUSIDA (2015).** Le sida en chiffre [http://www.unaids.org/fr/resources/documents/2015/AIDS\\_by\\_the\\_numbers\\_2015](http://www.unaids.org/fr/resources/documents/2015/AIDS_by_the_numbers_2015)
- 72. Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD (1998).** Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 1; 338:853-860.
- 73. Partec-Sysmex (2014).** CyFlow® Counter : The Complete Solution for HIV/AIDS Monitoring. <http://www.sysmexpartec.com/instrumentation/products.html>.
- 74. Partec-Sysmex (2014).** CyFlow® miniPOC True Point-of-Care Device for CD4 & CD4% Testing.
- 75. Passing H. and W. Bablok (1983).** A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry. *J Clin Chem Clin Biochem* ; 21:709-20.

- 76. Pattanapanyasat K, Phuang-Ngern Y, Sukapirom K, Lerdwana S, Thepthai C, Tassaneetrithep B (2008).** Comparison of 5 flow cytometric immunophenotyping systems for absolute CD4+ T-lymphocyte counts in HIV-1-infected patients living in resource-limited settings. *J Acquir Immune Defic Syndr* 49: 339-347.
- 77. Pattanapanyasat K, Sukapirom K, Kowawisatsut L, Thepthai C (2008).** New BD FACSCount CD4 reagent system for simultaneous enumeration of percent and absolute CD4 T-lymphocytes in HIV-1-infected pediatric patients. *Cytometry B Clin Cytom* 74 Suppl 1: S98-106. 10.
- 78. Pilly E, Hoen B, May T, Pialoux G (2007).** *Maladies infectieuses et tropicales*. CMIT-Collège des Universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales. Paris, 21<sup>ème</sup> ed. 2008; P736.
- 79. Quinn TC(2008).** HIV epidemiology and the effects of antiviral therapy on long-term consequences. *AIDS*; 22 (suppl III):7-12.
- 80. Quirós E, López-Cañabare MJ, Quirós A, Piédrola G, Maroto MC (1995).** Activation of cell death in lymphocytes from individuals infected with HIV. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*;13(9):522-6.
- 81. Richman, D. D., Wrin, T., Little, S. J., and C. J. Petropoulos (2003).** Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 100: 4144-4149.
- 82. Rosenberg, E.S., Billingsley, J.M., Caliendo, A.M., Boswell, S.L., Sax, P.E. and S.A. Kalams, (1997).** Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science*; 28:1447-50.
- 83. Rowley CF (2014).** Developments in CD4 and viral load monitoring in resource-limited settings. *Clin Infect Dis* 58: 407-412.
- 84. Schneider, V., (2003).** Quantification génomique: applications aux infections par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV). *Revue Française des Laboratoires*. (351 ) : 31-34.
- 85. Schnizlein-Bick CT, Spritzler J, Wilkening CL, Nicholson JK, O'Gorman MR (2000).** Evaluation of TruCount absolute-count tubes for determining CD4 and CD8 cell numbers in human immunodeficiency virus-positive adults. Site Investigators and The NIAID DAIDS New Technologies Evaluation Group. *Clin Diagn Lab Immunol* 7: 336-343.
- 86. Scott, L.E., Galpin, J.S. and D.K. Glencross (2003).** Multiple method comparison: statistical model using percentage similarity. *Cytometry B Clin Cytom* ; 54:46-53.

- 87. Siegal, F. P. and G. T. Spear (2001).** Innate immunity and HIV. *AIDS*, 15 (supplement 5): S127-S137.
- 88. Spacek LA, Shihab HM, Lutwama F, Summerton J, Mayanja H, Kanya M, Ronald A, Margolick JB, Nilles TL, Quinn TC (2006).** Evaluation of a low-cost method, the Guava EasyCD4 assay, to enumerate CD4-positive lymphocyte counts in HIV-infected patients in the United States and Uganda. *J Acquir Immune Defic Syndr* 41: 607-610.
- 89. Stamatatos, L. and D. Davis (2001).** New insights into protective humoral responses and HIV vaccines. *AIDS*, 15 (supplement5) S105-S115.
- 90. Stevenson, M. (2003).** HIV-1 pathogenesis. *Nat Med*; 9: 853-860.
- 91. Strauss K, Hannel I, Engels S, Shiba A, Ward DM, Ullery S, Jinguji MG, Valinsky J, Barnett D, Orfao A, Kestens L (1996).** Performance evaluation of the FACSCount System: a dedicated system for clinical cellular analysis. *Cytometry* 26: 52-59.
- 92. Sukapirom K, Onlamoon N, Thepthai C, Polsrila K, Tassaneetrithep B, Pattanapanyasat K (2011).** Performance evaluation of the Alere PIMA CD4 test for monitoring HIV-infected individuals in resource-constrained settings. *J Acquir Immune Defic Syndr* 58: 141-147. 10.
- 93. Task Force of BCSH, (1997).** Guidelines for enumeration of CD4+ T lymphocytes in immunosuppressed individuals. CD4+ T lymphocyte Working Party. *Haematology Clin. Lab. Haematol.* ; 19:231-241.
- 94. Thakar MR, Kumar BK, Mahajan BA, Mehendale SM, Paranjape RS (2006).** Comparison of capillary based microfluorometric assay for CD4+ T cell count estimation with dual platform Flow cytometry. *AIDS Res Ther* 3: 26.
- 95. Tite JP, Sloan A, Janeway CA, Jr. (1986).** The role of L3T4 in T cell activation: L3T4 may be both an Ia-binding protein and a receptor that transduces a negative signal. *J Mol Cell Immunol* 2: 179-190.
- 96. Tumbarello, M., Rabagliatib, R., De Gaetano, K., Donatia, Bertagnolioa, S., Tamburrinia, E., Tacconellia, E. and R. Caudaa, (2003).** Older HIV-positive patients in the era of highly active antiretroviral therapy: changing of a scenario. *AIDS*, 17 (1):128-131.
- 97. UNAIDS (2014).** The gap report.[http://www.unaids.org/sites/default/files/en/media/unaids/contentassets/documents/unaidspublication/2014/UNAIDS\\_Gap\\_report\\_en.pdf](http://www.unaids.org/sites/default/files/en/media/unaids/contentassets/documents/unaidspublication/2014/UNAIDS_Gap_report_en.pdf)

- 98. UNITAID (2013).** HIV/AIDS Diagnostic Technology Landscape.  
[http://www.unitaid.org/images/marketdynamics/publications/UNITAID-HIV\\_Diagnostic\\_Landscape-3rd\\_edition.pdf](http://www.unitaid.org/images/marketdynamics/publications/UNITAID-HIV_Diagnostic_Landscape-3rd_edition.pdf).
- 99. UNITAID (2014).** HIV/AIDS Diagnostics Technology Landscape 4th Edition.  
[http://www.unitaid.org/images/marketdynamics/publications/UNITAID-HIV\\_Diagnostic\\_Landscape-4th\\_edition.pdf](http://www.unitaid.org/images/marketdynamics/publications/UNITAID-HIV_Diagnostic_Landscape-4th_edition.pdf).
- 100. US Food and Drug Administration (2014).** Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection. <http://www.fda.gov/forpatients/illness/hivaids/treatment/ucml18915.htm>.
- 101. Wade D, Daneau G, Aboud S, Vercauteren GH, Urassa WS, Kestens L (2014).** WHO Multicenter Evaluation of FACSCount CD4 and Pima CD4 T-Cell Count Systems: Instrument Performance and Misclassification of HIV-Infected Patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 66: e98-e107.
- 102. Wade D, Diaw PA, Daneau G, Camara M, Dieye TN, Mboup S, Kestens L (2013).** CD4 T-Cell Enumeration in a Field Setting: Evaluation of CyFlow Counter Using the CD4 Easy Count Kit-Dry and Pima CD4 Systems. *PLoS One* 8: e75484. 10.1371.
- 103. Wade D, Diaw PA, Daneau G, Diallo AA, Mboup S, Dieye TN, Kestens L (2015).** Laboratory and Field Evaluation of the Partec CyFlow MiniPOC for Absolute and Relative D4 T-Cell Enumeration. *PLoS One* 10: e0116663.
- 104. Wei, X., Decker, J. M. and S. Wang (2003).** Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature*; 422: 307-312.
- 105. Weiss L., (2002).** Immunothérapie et infection par le virus de l'immunodéficience humaine. *Ann. Med. Interne* ; 153:227-36.
- 106. WHO (2012).** WHO Expert Meeting Report on Short, Medium and Longer Term Product Development Priorities in HIV-related Diagnostics.  
[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75971/1/9789241504522\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75971/1/9789241504522_eng.pdf).
- 107. WHO (2014).** WHO Prequalification of Diagnostics Programme Public Report. Product: BD FACSPresto Near-Patient CD4 Counter System.  
[http://www.who.int/diagnostics\\_laboratory/evaluations/140918\\_public\\_report\\_bdfacspresto\\_cd4.pdf](http://www.who.int/diagnostics_laboratory/evaluations/140918_public_report_bdfacspresto_cd4.pdf)

- 108. Winni De Haes, Charlotte Pollard, Guido Vanham, Joanna Rejman (2012).** "Wrapped up" Vaccines in the Context of HIV-1 Immunotherapy. *Nature Review Immunologie*; ISBN 978-953-51-0791-0.
- 109. Zajac, A. J., Blattman, J. N. and K. Murali-Krishna (1998).** Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *The Journal of Experimental Medicine*; 188:2205-2213

---

---

# Résumé

---

**Introduction :** La numération des lymphocytes T CD4 constitue le paramètre biologique le plus commun pour le suivi des patients sous traitement antirétroviral du fait de l'inaccessibilité de la charge virale dans les pays à ressources limitées. La cytométrie en flux est considérée comme la technique de référence pour la numération des lymphocytes T CD4. Cependant, leur utilisation est limitée aux laboratoires de référence due à leur coût et leurs exigences. Pour assurer l'élargissement de l'accès aux ARV, il y a eu l'émergence des techniques CD4 Point-Of-Care (POC) qui sont des techniques simples, portables et ne nécessitant pas de chaîne de froid et incluent le Pima CD4, le CyFlow miniPOC, le FACSPresto, *etc.* Le but de notre étude est d'évaluer le FACSPresto qui a comme objectifs spécifiques de déterminer sa précision, de mesurer sa concordance avec le FACSCalibur et avec le FACSCount, et de déterminer sa sensibilité et sa spécificité dans l'identification des patients devant être mis sous traitement.

**Méthodologie :** Notre population d'étude est constituée 192 enfants et adultes infectés par le VIH dont 37 sujets ayant un taux de CD4 < 200 cellules/mm<sup>3</sup>, 82 ayant un taux de CD4 compris entre 200 – 500 cellules/mm<sup>3</sup> et 73 avec un taux de CD4 > 500 cellules/mm<sup>3</sup>. Pour chaque échantillon la numération des lymphocytes T CD4 est faite avec le FACSPresto et les techniques de références à savoir le FACSCalibur et le FACSCount afin d'évaluer les performances de l'appareil. Pour évaluer la précision du FACSPresto, nous avons sélectionné trois échantillons, un échantillon avec un taux de CD4 < 200 cellules/mm<sup>3</sup>, un échantillon dont le taux de CD4 est compris entre 350 - 500 cellules/mm<sup>3</sup> et un échantillon avec un taux de CD4 > 500 cellules/mm<sup>3</sup>. Chacun de ces trois échantillon est répété dix fois le même jour pour déterminer sa variabilité intra essai, et analysé à J0, J1 et J2 pour la variabilité inter essai.

**Résultats:** L'évaluation de la variabilité intra essai du FACSPresto montre un CV moyen de 4,68% et 3,65% respectivement pour le taux de CD4 et le pourcentage de CD4 (CD4%). Elle montre également pour la variabilité inter essai, un CV moyen de 6,37% pour le taux de CD4 et un CV moyen de 1,01% pour les CD4%. La comparaison entre FACSCalibur et FACSPresto a montré pour les CD4 absolu un coefficient de corrélation de concordance de 0,982. Comparé au FACSCalibur, le FACSPresto a présenté un faible biais relatif moyen de 3,6% avec des limites d'agrément allant de -20,8% à +27,9% et une similarité moyenne de 102,4% avec un écart-type relatif de 8%. Et pour les CD4% un coefficient de corrélation de concordance de 0,988. Une bonne concordance a été trouvée avec un biais nul et des limites d'agrément (LOA) étroites allant de -3,6% à +3,7% ainsi qu'une très bonne similarité de 100,4% avec un écart-type relatif de 7%. La comparaison des taux de CD4 entre FACSCount et FACSPresto a montré un coefficient de corrélation de concordance de 0,979. Comparé au FACSCount, le FACSPresto a surestimé faiblement avec un biais relatif moyen de 3,8% avec des limites d'agrément (LOA) allant de -19,9% à 27,5% et une similarité moyenne de 102,3%.

**Conclusion:** Le FACSPresto, qui est une technique POC simple plateforme. Il fournit le taux et le pourcentage des lymphocytes T CD4 en plus du taux d'hémoglobine. Alimenté par une batterie interne rechargeable, le FACSPresto est portable et ne nécessite pas de chaîne de froid du fait de l'utilisation de cassettes contenant des réactifs lyophilisés. Il peut être utilisé aussi bien au laboratoire que dans le bureau des cliniciens avec du sang capillaire. Nos résultats ont montré une bonne précision et une bonne concordance du FACSPresto avec les techniques de références pour le comptage des lymphocytes TCD4. Ainsi, ce système constitue une bonne alternative aux cytomètres standards.

**Mots clés :** FACSPresto, Point-of-care CD4, infection à VIH, Numération des lymphocytes T CD4+, Pays à ressources limités