

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
PREMIERE PARTIE : GENERALITE SUR LE VIH/SIDA	4
1. HISTORIQUE ET ORIGINE DU VIH/SIDA.....	4
1.1. Historique.....	4
1.2. Origine	5
1.2.1. Origine du VIH-1	5
1.2.2. Origine du VIH-2.....	6
2. BIOLOGIE DU VIH	7
2.1. Définition et classification des VIH	7
2.2. Morphologie et structure du VIH-1	7
2.3. Organisation génomique du VIH-1.....	9
2.3.1. Les gènes de structure.....	10
2.3.2. Les gènes de régulation	12
2.3.3. Les gènes accessoires	13
2.3.4. Les LTR (pour long terminal repeat)	15
2.4. Tropisme du VIH	15
2.5. Cycle réplcatif du VIH	16
2.5.1. La phase précoce.....	17
2.5.2. La phase tardive.....	19
3. VARIABILITE GENETIQUE ET EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DU VIH.....	22
3.1. Variabilité génétique	22
3.2. Epidémiologie moléculaire du VIH.....	23
4. TRANSMISSION ET PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFECTION A L'INFECTION A VIH.....	26
4.1. Modes de transmission du VIH	26
4.1.1. La transmission horizontale	26
4.1.2. La transmission verticale	27
4.2. Physiopathologie de l'infection à VIH	27
4.2.1. La primo-infection.....	28
4.2.2. La phase asymptomatique	29

4.2.3. La phase chronique-----	29
5. PRISE EN CHARGE DE L'INFECTION A VIH.....	30
5.1. Diagnostic biologique du VIH -----	30
5.1.1. Le prélèvement-----	30
5.1.1.2. Le prélèvement sanguin sur tube-----	30
5.1.2. Les outils de diagnostic du VIH -----	31
5.2. Traitement de l'infection à VIH-----	33
5.2.1. Les molécules antirétrovirales -----	33
5.2.2. Le choix thérapeutique (OMS, 2015)-----	35
5.3. Quantification du VIH ou charge virale-----	36
5.3.1. Définition -----	36
5.3.2. Les techniques de quantification du VIH-1 -----	37
5.4. Prise en charge des enfants infectés par le VIH-----	38
5.4.1. Le diagnostic de l'infection par le VIH chez l'enfant selon l'OMS 2013 -----	39
5.4.2. Le suivi biologique de l'infection -----	40
5.4.3. Le traitement ARV chez l'enfant-----	42
5.4.4. L'échec thérapeutique-----	44
6. UTILITE DU PAPIER BUVARD DANS LE.....	48
MONITORING VIROLOGIQUE.....	48
6.1. Propriétés du papier buvard-----	48
6.2. Les avantages du papier buvard -----	49
DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL	50
1. CONTEXTE, JUSTIFICATIFS ET CADRE D'ETUDE.....	50
1.1. Contexte et Justificatifs de l'étude-----	50
1.2. Cadre de l'étude -----	52
2. METHODOLOGIE	54
2.1. Echantillonnage -----	54
2.1.1. Matériels de prélèvement et de confection des DBS -----	54
2.1.2. Confection, acheminement et stockage des DBS -----	57
2.4. Approche analytique -----	59
2.4.1. Les matériels et réactifs d'extraction et d'amplification de l'ARN du VIH à partir de DBS par la technologie NucliSENS EasyQ HIV-1 V 2.0 -----	60

2.4.2. L'extraction des acides nucléiques (ARN du VIH) par NucliSENS EasyMag ou MiniMag	61
2.4.3. L'amplification et la détection par la technologie NucliSENS EasyQ HIV-1 V2.0	62
2.5. Analyse statistique des données	64
3. RESULTATS	66
3.1. Echantillon étudié.....	66
3.2. Caractéristiques de la population d'étude	66
3.2.1. La répartition du nombre d'inclusions en fonction des axes.....	66
3.2.2. La répartition des patients inclus selon l'âge.....	66
3.2.3. La répartition des patients inclus selon le traitement ARV	67
3.3. Etude comparative	68
3.3.1. Les résultats de la CV obtenue à partir des DBS μ P	68
3.3.2. Les résultats de la CV obtenue à partir des DBSPP	69
3.3.3. La comparaison des valeurs de CV des deux méthodes.....	69
3.3.4. La droite de régression linéaire et la concordance entre les deux techniques (DBS μ P et DBSPP)	71
3.4. Evaluation virologique	72
3.4.1. Les résultats de la CV.....	72
3.4.2. Les résultats de la CV en fonction de la durée de suivi du TARV	73
3.4.3. L'échec virologique en fonction du schéma thérapeutique.....	74
COMMENTAIRES ET DISCUSSION	75
CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	76
REFERENCES	76

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure du VIH-1 (30).....	9
Figure 2 : Organisation du génome du VIH-1 et expression des gènes (34)...	10
Figure 3 : Cycle de réplication du VIH-1 (26).....	16
Figure 4 : Différentes phases de l'entrée du virus dans la cellule hôte (67). .	17
Figure 5 : Schéma de la transcription inverse de l'ARN viral (http://georges.dolisi.free.fr/Physiopathologie/sida_infection.htm)	18
Figure 6 : Intégration de l'ADN virale dans le noyau cellulaire (http://georges.dolisi.free.fr/Physiopathologie/sida_infection.htm)	19
Figure 7 : Schéma de la transcription de l'ADN viral (http://georges.dolisi.free.fr/Physiopathologie/sida_infection.htm)	20
Figure 8 : Schéma de la traduction de l'ARNm (http://georges.dolisi.free.fr/Physiopathologie/sida_infection.htm)	21
Figure 9 : Différentes phases de l'évolution d'une infection par le VIH.....	28
Figure 10 : Echec thérapeutique chez les enfants, OMS 2015	45
Figure 11 : Conduite à tenir en cas d'échec virologique, OMS 2013	46
Figure 12 : Photographie de papier buvard.....	49
Figure 13 : Carte des structures sanitaires du Sénégal (http://www.sendocteur.com/carte.php .)	50
Figure 14 (A à F) : Matériel de prélèvement sur tube EDTA.....	55
Figure 15 (A à C) : Matériel d'un kit de DBS	56
Figure 16 : Prélèvement sur tube et les étapes de la confection des DBS	58
Figure 17 : Sites de prélèvement et moyen d'acheminement des échantillons	59
Figure 18 : Equipement du NucliSENS v.2.0.....	60
Figure 19 : Principe d'extraction automatisée sur miniMAG (A) et automatisée sur easyMAG (B) (http://www.biomerieux.ch)	61
Figure 20 : Principe de la réaction d'amplification par NASBA	62
Figure 21 : Schéma d'une balise moléculaire (A) et son action sur l'ARN (B)	63
Figure 22 : Répartition des enfants selon les tranches d'âge.....	67

Figure 23 : Répartition des enfants selon le traitement 68

Figure 24 : Droite de Régression (A) et Bland-Altman (B) DBS μ P vs DBSPP
..... 71

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Origine et épidémiologies moléculaires des VIH-1 et VIH-2 (82)	24
Tableau II : Schémas de TARV de première intention privilégiés et autres options conseillées (OMS 2015).....	35
Tableau III : Changement de schéma ARV en cas d'échec thérapeutique (OMS 2015).....	36
Tableau IV : Modalités du suivi biologique chez l'enfant (OMS 2015).....	41
Tableau V: Schéma thérapeutique de 1ière ligne chez l'enfant (OMS 2013).....	43
Tableau VI : Schéma thérapeutique chez l'enfant	47
Tableau VII : Répartition du nombre d'enfant en fonction des prélèvements	66
Tableau VIII : Valeurs de CV DBS μ P.....	68
Tableau IX : Valeurs de CV DBSPP	69
Tableau X : Similarité des deux méthodes en termes de détectabilité et de non détectabilité des valeurs de CV	70
Tableau XI : Différences de log des valeurs de CV des deux prélèvements de DBS	71
Tableau XII : Valeurs de CV et les différences de log des échantillons ayant montré une discordance	72
Tableau XIII : Distribution des valeurs de CV	73
Tableau XIV : Charge virale en fonction de la durée de suivi chez les enfants sous TARV depuis au moins 6 mois	73
Tableau XV : Nombre d'enfants en échec en fonction du schéma thérapeutique et la durée de suivi	74

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac	Anticorps
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ARNt3Lys	ARN de transfert de la lysine
ARV	Antiretroviraux
AZT	Zidovudine
CA	Protéine de la Capside
CCR5	CC chemokine Receptor type 5 (Récepteur de chimiokines 5)
CD4+	Classe de Différenciation 4 exprimée
CDC	Center Disease Control
CHNU	Centre Hospitalier National Universitaire
CHR	Centre Hospitalier Régional
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CRF	Circulating Recombinant Form (formes recombinantes circulantes)
CS	Centre de Santé
CV	Charge Virale
CXCR4	CXC chemokine receptor type 4 (récepteur de chimiokines 4)
DBS	Dry Blood Spot (Spots de Sang Séché)
DBS μ P	DBS réalisés avec la micropipette
DBSPP	DBS réalisés avec la pipette pasteur.
dNTP	2'-desoxyribonucléotide 5'-triphosphate
EDTA	Ethylène Diamine Tétra-Acétique
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EnPRISE	Enfant Prise en charge

env	Gène de l'enveloppe
gag	Gène des Antigènes de Groupe
gp	Glycoprotéine
gp 41	Glycoprotéine 41
gp120	Glycoprotéine 120
GRID	Gay-Related Immunodeficiency Disease
HALD	Hôpital Aristide Le Dantec
HSH	Hommes ayant des rapports Sexuels avec des d'autres Hommes
IF	Inhibiteurs de Fusion
IgG	Immunoglobuline G
IIN	Inhibiteurs de l'Intégrase
IL	Interleukine
IN	Intégrase
INNTI	Inhibiteurs Non Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse
INTI	Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse
IP	Inhibiteur de la Protéase
ISAARV	Initiative Sénégalaise d'Accès aux Antirétroviraux
IST	Infections Sexuellement Transmissibles
LBV-HALD	Laboratoire de Bactériologie et de Virologie de HALD
LT CD4	Lymphocytes T Cluster of Differentiation 4 (Protéine de differentiation 4)
LT CD8	Lymphocytes T Cluster of differentiation 8 (Protéine de differentiation 8)
LTC	Lymphocytes T Cytotoxiques
LTR	Long Terminal Repeat
MA	Matrice
NASBA	Nucleic Acid Sequenced Base Amplification
NC	Nucléocapside

nef	Gène Negative Expression Factor
NFS	Numération Formule Sanguine
NK	Naturel Killer
OMS	Organisation Mondiale de Santé
ONUSIDA	Organisation des Nations Unies pour le SIDA
P15	Protéine 15
P17	Protéine 17
p24	Protéine 24
P51	Protéine 51
P55	Protéine 55
P66	Protéine 66
p7	Protéine 7
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEC	Prise En Charge
pol	Gène de la Polymerase
PPT	Poly Purine Tracts
PR	Protéase
Pr160Gag-Pol	Polyprotéine 160 Gag –Pol
Pr55Gag	Polyprotéine Gag
PT	Pipette de Transfert
PTME	Prévention de la Transmission Mère-Enfant
PvVIH	Personnes Vivant avec le VIH
R5	Récepteur de type 5
RARS	Réseau Africain de Recherche sur le SIDA
RER	Réticulum Endoplasmique Rugueux

rev	Gène Regulator of Expression Virus
RNase H	Ribonucléase H, (enzyme de dégradation de l'ARN)
RRE	Rev Responsive Element
SIDA	Syndrôme de l'Immunodéficience Acquise
TAR	TransActing Region
TARV	Traitement Antirétroviral
tat	Gène Trans-Activator of Transcription
TI	Transcriptase Inverse
TM	Transmembranaire
up	Micropipette
URF	Unique Recombinant Form (Formes Recombinantes Uniques)
vif	Gène Virion Infectivity Factor
VIH	<i>Virus de l'Immunodéficience Humaine</i>
VIH-1	<i>Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1</i>
VIH-2	<i>Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 2</i>
VIS	<i>Virus de l'Immunodéficience Simienne</i>
VIScpz	<i>Virus de l'Immunodéficience Simien des chimpanzés</i>
VISgor	<i>Virus de l'Immunodéficience Simien des gorilles</i>
vpr	Gène Viral protein R
vpu	Gène Viral Protein U
vpx	Gène Viral Protein X
WB	Western Blot
X4	Récepteur de type 4

INTRODUCTION

Rapport-Gratuit.com

Le Syndrome de l'Immunodéficience Acquise, plus connu sous son acronyme SIDA, est un ensemble de symptômes consécutifs à la destruction de plusieurs cellules du système immunitaire par un rétrovirus. Il existe plusieurs rétrovirus responsables du SIDA, chacun infectant une espèce particulière et le plus connu d'entre eux est le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH), infectant l'homme. L'infection à VIH/SIDA est actuellement une des plus importantes et plus meurtrières pandémies dans le monde. Deux types de VIH, appartenant à la famille des *Retroviridae* et du genre des *lentivirus*, sont aujourd'hui décrits, à savoir, le VIH de type 1 (VIH-1) et le VIH de type 2 (VIH-2) (1) qui sont des virus à ARN caractérisés par la présence d'une enzyme spécifique appelée la transcriptase inverse. Le VIH-1 est assez répandu dans le monde entier alors que le VIH-2 reste particulièrement confiné en Afrique de l'Ouest (2). Le VIH-1 est subdivisé en quatre groupes, dont le groupe majoritaire, dénommé M, avec 98% des infections dans le monde, le groupe O où « outlier » et les très rares variantes des groupes N et P (3). Au sein du groupe M, il existe 9 sous-types purs (A, B, C, D, F, G, H, J et K) et des formes recombinantes uniques ou circulants (4). Le VIH-2 quant à lui, est subdivisé en 9 groupes (5, 6).

Cette grande variabilité génétique du VIH couplée avec son pouvoir pathogène, sont responsables de la pandémie du VIH dans le monde. Ainsi les derniers statistiques de 2015 de l'ONUSIDA ont fait état de 36,9 millions de personnes [34,3–41,4 millions] vivant avec le VIH dont 2 millions [1,9 millions-2,2 millions] de personnes nouvellement infectées. L'Afrique Subsaharienne reste la région la plus touchée avec un nombre total de 25,8 millions [24,0 millions–28,7 millions] de personnes vivant avec le VIH en fin 2014 (7). Au Sénégal où l'épidémiologie du VIH est de type concentré, la prévalence en fin 2014 est estimée à 0,5% [0,4% -0,6%] (8) au niveau de la population générale avec des prévalences élevées dans les populations clés telles que les professionnelles du sexe.

L'évolution rapide de l'infection à VIH et sa prévalence élevée ont provoqué la mobilisation du monde scientifique et de la pharmacie industrielle autour du

développement de molécules antirétrovirales (ARV). Ces dernières ont pour rôle de bloquer la réplication virale et de retarder la progression de la maladie et ainsi de réduire considérablement la morbidité et la mortalité liées au VIH, grâce aux programmes d'accès aux traitements antirétroviraux (TARV) (9). Cependant, le suivi thérapeutique des personnes infectées par le VIH est très souvent perturbé par des cas d'échec thérapeutiques. Ainsi l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommande d'intégrer le monitoring immunologique par la numération du taux de lymphocytes T CD4+ et le suivi virologique par la quantification de la charge virale (CV) plasmatique dans les programmes d'accès au TARV (10). La CV est utilisée comme le marqueur biologique de référence pour s'assurer de l'efficacité des schémas thérapeutiques utilisés chez les adultes comme chez les enfants (11). La quantification de la CV, pour les adultes infectés par le VIH, est le plus souvent effectuée à partir d'un prélèvement de sang total sur tube EDTA et ceci au niveau des laboratoires de référence. A côté d'un prélèvement de sang sur tube, le prélèvement sur papier buvard (Le Dry Blood Spot (DBS)) constitue une bonne alternative comme support de prélèvement et utilisé pour les adultes comme pour les enfants qui sont suivis dans les zones décentralisées (12). En effet plusieurs contraintes sont liées au prélèvement sur tube à savoir le problème de volume minimal de sang, les risques de coagulation, les contraintes de centrifugation, le maintien de la chaîne de froid pendant le transport depuis les zones décentralisées vers les laboratoires de référence. Au Sénégal, depuis 2008, le DBS a été validé pour la quantification de la CV et l'étude des mutations de résistance (13). Cependant, le renforcement de la prise en charge thérapeutique des enfants infectés par le VIH, dans toutes les régions décentralisées du Sénégal, a été instauré à travers le projet EnPRISE. Des études préliminaires ont montré des résultats concluants en termes de CVs effectuées à partir de volume connu de sang total sur DBS réalisés avec une micropipette calibrée. Cette dernière est un outil qui, est non seulement pas toujours disponible dans les laboratoires en zone décentralisée, mais aussi qui nécessite des calibrations régulières par un service de métrologie qui fait souvent défaut dans ces zones. Disposer d'un

autre système de pipetage à usage simple et moins onéreux ne nécessitant pas de calibration pour la confection des DBS, serait d'un grand apport dans la prise en charge et le suivi thérapeutique des enfants infectés par le VIH en zones décentralisées. Nous postulons que, la pipette pasteur ou pipette de transfert serait une bonne alternative à la micropipette pour la confection des spots de sang pour la quantification de la CV et l'étude des mutations de résistance chez les PvVIH, plus particulièrement chez les enfants en milieu décentralisé. Ainsi nous nous proposons comme objectif d'évaluer la pipette pasteur comme outil alternatif à la micropipette pour la confection des DBS et de mesurer l'efficacité virologique chez les enfants infectés par le VIH en milieu décentralisé au Sénégal. Pour répondre à ces objectifs, notre plan de travail se présentera comme suit :

- une première partie de généralités sur l'infection à VIH/SIDA,
- une deuxième partie qui présentera notre méthodologie expérimentale et les résultats,
- Et en fin, une discussion des résultats obtenus pour en tirer une conclusion et dégager des perspectives.

PREMIERE PARTIE:

GENERALITES SUR LE VIH/SIDA

PREMIERE PARTIE : GENERALITE SUR LE VIH/SIDA

1. HISTORIQUE ET ORIGINE DU VIH/SIDA

1.1. Historique

Les origines du VIH seraient liées au virus de l'immunodéficience simien (VIS) infectant les singes. Selon des données épidémiologiques moléculaires, ces deux virus ont montré des liens phyllogénétiques suggérant que l'Homme serait infecté à partir du singe (1).

Les SIVs, qui n'étaient pas responsables d'une immunodéficience chez les singes, auraient franchi la barrière d'espèce et infecté l'Homme pour donner naissance au VIH. Ce dernier, est responsable d'une destruction massive des cellules immunitaires de l'Homme et provoque, dans le long terme, une maladie dénommée Syndrome de l'Immunodéficience Acquise (SIDA) (14). Les conditions et les circonstances de ces transferts du singe vers l'Homme demeurent mal comprises, mais cela a dû arriver à la suite d'une morsure par un animal, ou par une écorchure à l'occasion du dépeçage d'un animal infecté (1). Ce phénomène se serait produit dans l'ouest de l'Afrique centrale dans des pays comme le Cameroun, la Guinée équatoriale, le Gabon et le Congo Brazzaville. A partir de ces pays, le virus aurait remonté le fleuve Congo pour gagner d'abord d'autres parties de ce qui est aujourd'hui la République démocratique du Congo pour se répandre ensuite dans d'autres régions d'Afrique (15). Le SIDA a été rapporté pour la première fois aux États-Unis en 1981 par les *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dans la littérature médicale (*Morbidity and Mortality Weekly Report* 5 juin 1981). Cette publication décrivait l'état de cinq jeunes homosexuels mâles à Los Angeles souffrant d'immunodéficience sévère accompagnée d'une rare pneumonie causée par le *Pneumocystis carinii* (http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/june_5.htm). D'autres rapports ont rapidement suivi dans la littérature et en l'espace de quelques mois l'épidémie avait pris racine. Les premiers malades étant exclusivement des homosexuels et le

syndrome a été appelé par certains le gay-related immunodeficiency disease (GRID) **(16)**.

Toutefois, entre 1981 et 1983 il est apparu évident qu'une immunodéficience similaire touchait d'autres groupes d'individus. Il s'agissait des Haïtiens récemment immigrés, les hémophiles, les transfusés, les toxicomanes, les usagers de drogues... Ces patients souffraient tous d'une déplétion marquée des lymphocytes T CD4+ dans le sang périphérique (<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml>).

C'est en 1983 que les soupçons vont être portés sur un agent infectieux viral présentant une activité enzymatique (transcriptase inverse) ainsi qu'un phénomène de mort des lymphocytes CD4. L'agent étiologique de ce syndrome qui a été isolé à la même date fut dénommé VIH-1 **(17)**. Et en 1985, un deuxième virus similaire au VIH-1 mais avec quelques différences génétiques a été isolé et décrit en 1986 à partir de Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) et fut dénommé VIH-2 **(18)**.

1.2. Origine

Des études d'épidémiologie moléculaire ont démontré une origine simienne des VIH et ceci à travers plusieurs épisodes de franchissements de la barrière d'espèce donnant naissance aux types et groupes de VIH **(19)**.

1.2.1. Origine du VIH-1

Les VIH-1 du groupe M et N proviennent des chimpanzés vivant au Cameroun plus particulièrement l'espèce *Pan troglodytes troglodytes* alors que l'ancêtre du VIH-1 du groupe O est associé à d'autres types à savoir les gorilles avec l'espèce *Gorilla gorilla* **(20)**.

Les analyses phylogénétiques laissent suggérer que les gorilles auraient été infectés à partir des chimpanzés. Ceci laisse supposer que les VIH-1 proviendraient d'une seule et unique lignée de SIVcpz/SIVgor mais par l'intermédiaire d'au moins quatre transmissions indépendantes des virus de cette lignée, donnant ainsi les 4 groupes M, N, O et P **(21)**. En effet, les relations phylogénétiques entre SIVcpz, SIVgor et VIH-1

indiquent que les chimpanzés représentent le réservoir original des SIVs qui sont aujourd'hui présents chez les chimpanzés, les gorilles et chez l'homme (20).

1.2.2. Origine du VIH-2

Une relation phylogénétique, a également été observée entre les SIVsmm du mangabey enfumé, *Cercocebus atys* et le VIH-2 d'Afrique de l'Ouest. Du point de vue taxonomique, huit groupes de VIH-2 (A à H) ont été décrits, mais seuls les groupes A et B sont responsables de l'épidémie à VIH-2 et circulent principalement en Guinée Bissau et au Sénégal pour le groupe A et en Côte d'Ivoire pour le groupe B (5). Les autres groupes n'infectent que peu d'individus et sont représentés dans des pays comme le Libéria et la Sierra Léone (22). Une étude menée en 2013 a identifié une nouvelle souche de VIH-2 (07IC-TNP03) distincte des groupes existants et qui serait dénommé 9^{ème} groupe du VIH-2 (6).

2. BIOLOGIE DU VIH

2.1. Définition et classification des VIH

Les VIH sont des *lentivirus* appartenant à la famille des *Retroviridae* ou Rétrovirus et à la sous-famille des *Orthoretrovirinae*. Les *Retroviridae* sont représentés par une large famille de virus à ARN caractérisée par la présence d'une enzyme structurale appelée la transcriptase inverse (TI) et par leur mode de répliation. Ils passent par une étape de rétrotranscription de leur matériel génétique constitué de deux molécules d'ARN identiques en ADN grâce à cette enzyme. Il s'en suit une intégration de l'ADN néoformé dans le génome de la cellule hôte où la répliation se fera en même temps avec cette dernière (23).

Selon la dernière classification remontant en 2003, la famille des Rétrovirus est subdivisée en sept genres regroupés en deux sous familles ; celle des Spumaretrovirinae composée du seul genre Spumavirus et celle des Orthoretrovirinae subdivisée en 6 genres : Alpharetrovirus, Bétaretrovirus, Gammaretrovirus, Deltaretrovirus, Epsilonretrovirus et les Lentivirus (24).

2.2. Morphologie et structure du VIH-1

Au microscope électronique, le VIH mature se présente sous la forme d'une particule sphérique enveloppée de 80-120 nm de diamètre (25) (figure 1). Il comprend de l'extérieur vers l'intérieur :

- **une enveloppe virale** constituée d'une bicouche lipidique qui provient de la membrane plasmique de la cellule hôte, acquise par le virus lors de sa sortie par bourgeonnement. Cette membrane porte deux types de glycoprotéines, la gp120 et la gp41. La glycoprotéine 120 (gp120) est une partie importante de l'enveloppe qui orne la surface du virus et une des principales cibles des anticorps neutralisants. La gp120 est attachée de façon non covalente à la gp41 qui elle, traverse la bicouche lipidique et est appelée glycoprotéine transmembranaire gp41.

Les protéines d'enveloppe gp120 et gp41 jouent un rôle crucial de récepteur dans la liaison et la fusion membranaire du virus avec les lymphocytes CD4 (26),

- **une matrice** située sous la bicouche lipidique, elle est constituée par la P17 codée par le gène *gag*. Elle est liée à la surface interne de l'enveloppe par l'intermédiaire d'un acide myristique et stabilise la structure du virus. Dans la matrice se trouve aussi d'autres protéines accessoires que sont Nef, Vif, Vpr, Rev, Tat et Vpu. La matrice sépare ainsi physiquement l'enveloppe de la capside virale (27),
- **une capside** de symétrie conique, localisée au centre de la particule du virus protégeant l'ARN viral, elle est constituée par la protéine P24 codée par le gène *gag*. A l'intérieur de cette capside se trouvent (28) :
 - une nucléocapside (NC) ou core constituée principalement par la protéine basique P7, enveloppant le génome pour former un complexe ribonucléoprotéique. Le rôle de la NC dans les étapes précoces de la réplication rétrovirale semble être celui d'un facilitateur pour l'intégration et la transcription inverse. .
 - Le génome constitué de deux copies identiques d'ARN simple brin, linéaire, de polarité positive et d'environ 9,2 Kb.
 - Trois enzymes virales à savoir, la transcriptase inverse (TI), l'intégrase (IN) et la protéase (PR).
 - La protéine p6, nécessaire au passage du génome viral dans le noyau de la cellule infectée. Elle joue un rôle dans l'incorporation du Viral Protein R (VPR) lors de l'assemblage de particules virales et module les interactions membranaires du gène *gag* du VIH. Il régule l'étape finale de la libération des virions naissants de la membrane cellulaire par une action tardive (29).

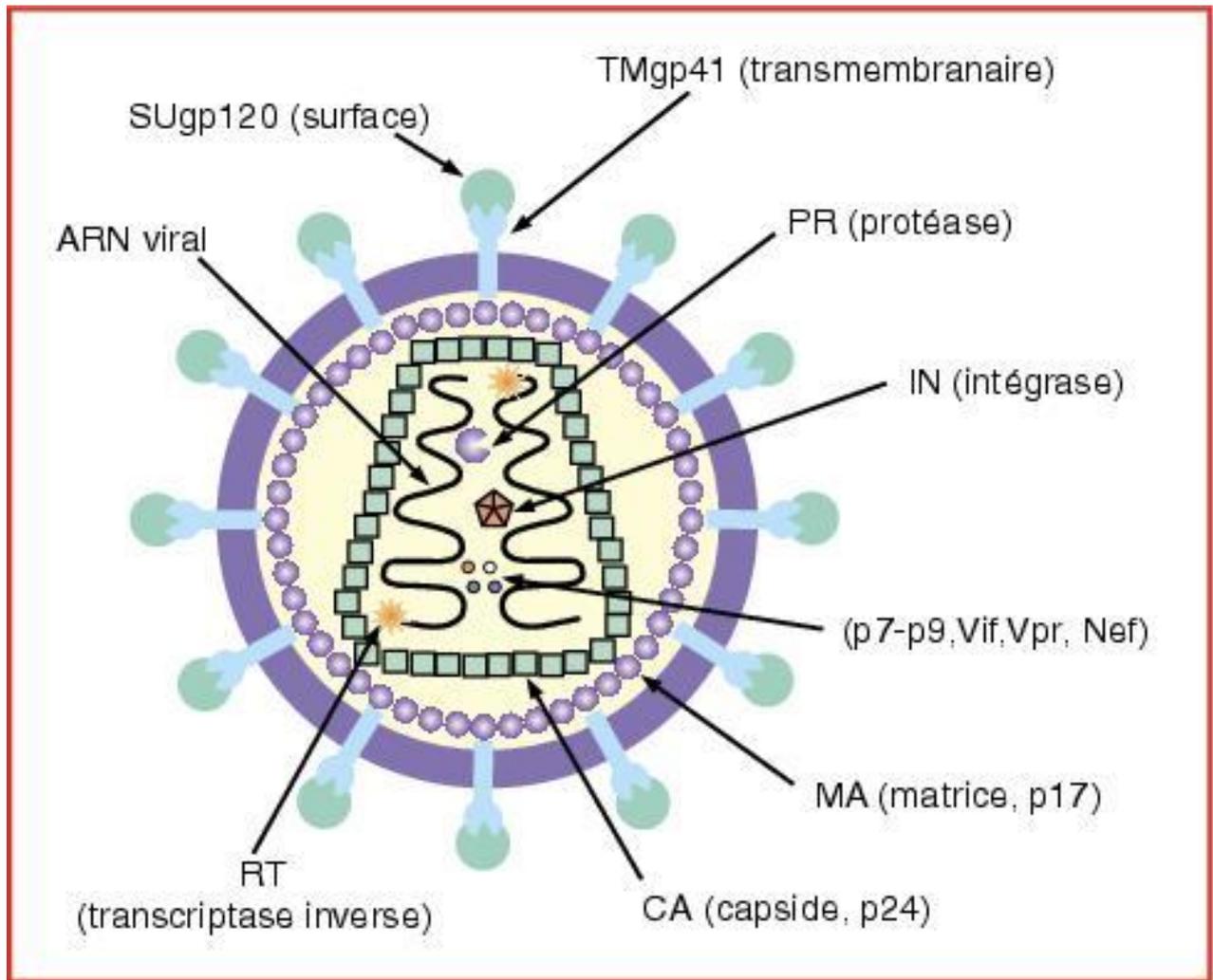


Figure 1 : Structure du VIH-1 (30)

2.3. Organisation génomique du VIH-1

Le génome viral est constitué de deux copies d'ARN simple brin identiques de 9200 nucléotides. Ce génome contient trois gènes principaux ou gènes de structure que sont *gag*, *pol*, *env*, (figure 2) (31) qui mènent ensuite à la formation de diverses autres protéines. A côté des gènes de structure il contient également deux gènes régulateurs *tat* et *rev* et quatre gènes accessoires *vpu*, *vpr*, *vif* et *nef*, impliqués dans des phénomènes de régulation de l'expression des protéines virales et la multiplication du virus (32). Outre ces neuf gènes, chaque extrémité du génome renferme des séquences non codantes appelées Long Terminal Repeat (LTR) contenant de nombreux sites potentiels de liaison avec des protéines cellulaires (33).

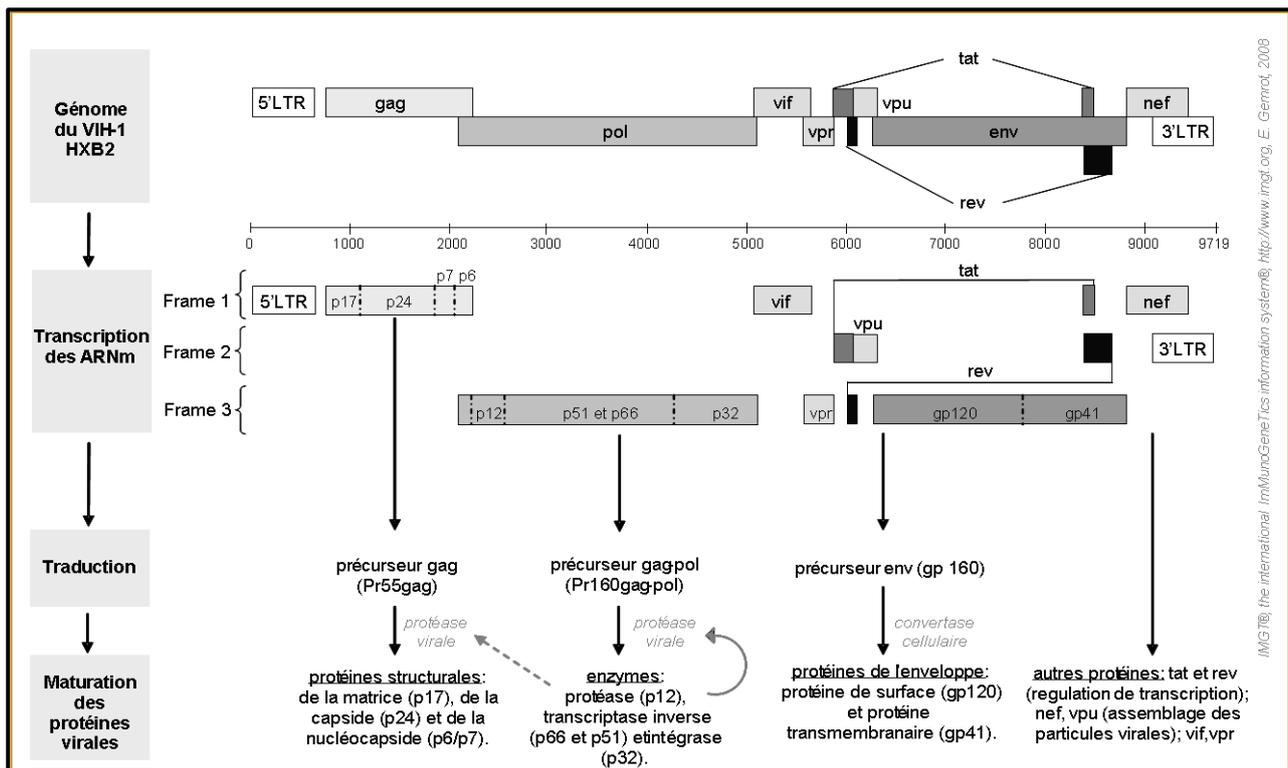


Figure 2 : Organisation du génome du VIH-1 et expression des gènes (34)

2.3.1. Les gènes de structure

Ces gènes de structure qui sont au nombre de trois : *gag*, *pol* et *env* sont respectivement responsables de la synthèse des protéines de structure, des enzymes virales et des protéines de surfaces.

➤ Le gène *gag* (gène des antigènes de groupe)

Le gène *gag* est le premier cadre de lecture ouvert sur le génome du VIH. Il fait environ 1500 pb (paires de bases) et code pour la polyprotéine Pr55^{Gag} qui comprend quatre domaines majeurs : la matrice (MA), la capsid (CA), la Nucléocapside (NC) et la p6 (voir Figure 3). Au cours de la maturation, le clivage de la Pr55^{Gag} par la protéase virale (PR), donne de l'extrémité N-terminale vers C-terminale, les protéines structurales du virion mature : p17MA, p24CA, p7NC, p6 et 2 petits fragments de peptides p1_{gag} et p2_{gag} (35).

➤ **Le gène *pol* (polymérase)**

C'est le gène le plus conservé du génome viral faisant environ 3000pb et il code pour une poly protéine Gag-Pol. Cette polyprotéine possède à son extrémité un petit gène qui code pour une protéase dont le rôle est de cliver les protéines produites par le gène *pol*. Après clivage, cette polyprotéine donne naissance aux trois enzymes principales du virus que sont : la protéase (PR), la transcriptase inverse (TI) et l'intégrase (IN).

- **La protéase virale (PR)** : enzyme de clivage jouant un rôle indispensable dans le cycle de réplication. Elle assure le clivage et la maturation des précurseurs Gag et Gag-Pol pour produire des protéines matures et fonctionnelles **(36)**.
- **La transcriptase inverse (TI)** est une enzyme ADN polymérase ARN dépendante assurant la rétrotranscription de l'ARN viral simple brin en ADN proviral double brin capable de s'intégrer dans le génome cellulaire. Lors du cycle de réplication, elle fait intervenir de nombreuses erreurs de copies, du fait de l'absence d'une fonction correctrice, ce qui la rend responsable de la grande diversité génétique du VIH et l'apparition des mutations de résistance. La TI se présente sous forme d'hétérodimère constitué de 2 sous unités, la P66 et la P51 **(37)**.
- **L'intégrase (IN)**, est un enzyme d'une importance capitale dans la réplication virale, assurant ainsi l'intégration de l'ADN viral néoformé dans le génome cellulaire **(38)**.

➤ **Le gène *env*. (enveloppe)**

C'est le gène le plus variable avec une longueur d'environ 2500pb. Il code pour les glycoprotéines d'enveloppe, gp120SU et gp41TM qui sont responsables de la fixation du virus sur le récepteur cellulaire et son entrée dans la cellule hôte. Il est caractérisé par un polymorphisme important qui permet au virus d'échapper au système immunitaire **(39)**. Les glycoprotéines Env sont initialement synthétisées sous forme d'un précurseur polyprotéique, la gp160 qui sera modifiée par glycosylation avant d'être clivée par une protéase cellulaire en 2 protéines (gp120 et gp41).

➤ **La glycoprotéine de surface Gp120**

La glycoprotéine de surface gp120 (SU) est composée d'environ 480 acides aminés. Elle est organisée en cinq régions constantes (C1-C5) dont les séquences sont semblables quelle que soit la souche virale et cinq régions variables (V1-V5) appelées boucles variables, qui montrent une grande variabilité inter-souches (40). La gp120 se lie aux cellules hôtes via les récepteurs membranaires CD4 et CXCR4 ou CCR5 et joue un rôle indispensable dans la pénétration du virus. Ces interactions conduisent à des changements de structure de la gp120 (41).

➤ **La glycoprotéine transmembranaire (TM) Gp41**

La glycoprotéine gp41 TM est composée d'environ 345 acides aminés. Elle comporte un domaine de fusion (FD) constitué d'une région hydrophobe du côté N-terminal, deux domaines en hélice « Heptad Repeats » (HR1 et HR2), un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique. Ainsi la gp120 permet à la gp41 de s'ancrer, grâce à son domaine de fusion dans la membrane de la cellule cible. Cette étape est suivie par l'interaction entre les domaines HR1 et HR2, dans leur forme trimérique, permettant le rapprochement puis la fusion des membranes (virale et cellulaires) (42).

2.3.2. Les gènes de régulation

➤ **Le gène *tat* (trans-activator of transcription)**

Sa fonction essentielle est d'activer la transcription des ARNm viraux. Il code pour la protéine Tat (*trans-activator of transcription*) qui agit en activant la réplication virale au niveau d'une séquence cible appelée TAR (TransActing Region) située dans le LTR (43). La protéine Tat est responsable de l'infectiosité des cellules dites réservoirs et constitue un facteur d'échec au traitement antirétroviral (44). Elle aurait également une activité, très largement controversée, de régulation sur la transcription inverse de l'ARN en ADNc (45).

➤ **Le gène *rev* (regulator of expression virus)**

C'est le second facteur de régulation nécessaire à l'expression et à la maturation virale. Il code pour la phosphoprotéine de 19 kd, pp20Rev qui s'accumule dans le nucléole de la cellule hôte. Il intervient dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes de structure en assurant la stabilisation et le transport des transcrits primaires ou mono-épissés du noyau au cytoplasme (46).

A côté de cette activité régulatrice de l'expression de gènes, la Protéine Rev pourrait intervenir dans l'intégration de l'ADN proviral en contrôlant l'activité de l'intégrase (47).

2.3.3. Les gènes accessoires

Ces gènes accessoires jouent un rôle important dans les interactions virus-hôte et ont un fort impact sur les conséquences de l'infection à VIH. Par conséquent, la présence ou l'absence des protéines de ces gènes accessoires peut considérablement modifier le cours et la gravité de l'infection virale (48).

➤ **Le gène *vif* (virion infectivity factor)**

Il code pour une protéine basique de 23kd qui intervient dans l'infectiosité des particules virales (49). La protéine Vif est requise pendant la multiplication des cellules exprimant un facteur antiviral dénommé APOBEC3G où il s'oppose à son encapsidation. APOBEC3G est une cytidine désaminase qui, en entraînant la désamination des desoxycytidine, va induire la formation d'ADN contenant un codon stop et qui va être éliminé par la machinerie cellulaire (50). Cependant, le virus a mis en place une stratégie pour supprimer l'action antivirale de l'APOBEC3G. La protéine Vif, en se liant directement à APOBEC3G, favorise sa dégradation par le recrutement d'une ligase spécifique appelée E3 (51). Vif joue également un rôle dans la stabilisation du complexe nucléoprotéique par une liaison directe avec la région 5' du génome et régule la transcription inverse en favorisant entre autre la liaison de l'ARNt^{Lys} avec l'enzyme (52).

➤ **Le gène *vpr* (viral protein R)**

Il code pour une protéine de 14 kd qui contribue à la pathogenèse du VIH-1 à travers la transactivation des LTR et le transport du complexe de pré intégration dans le noyau. Intervenant dans la transcription inverse, elle influence la fidélité de l'enzyme dont le taux d'erreur est réduit d'environ 4 fois grâce à son interaction avec l'uracil DNA glycosylase (UNG) (53).

Les molécules de Vpr sont cytotoxiques. Elles induisent l'arrêt du cycle cellulaire et capables d'induire l'apoptose par action directe sur les mitochondries (54).

➤ **Le gène *vpu* (viral protein U)**

Vpu est le plus petit des gènes, codé par le VIH. Ce gène *vpu* est retrouvé dans le génome du VIH-1 et du SIV_{CPZ} et non dans le génome du VIH-2 où il est remplacé par le gène *vpx* (55). Il interagit avec la molécule CD4 au niveau du réticulum endoplasmique rugueux (RER), entraînant sa dégradation par la voie du protéasome. Le gène *vpu* joue un rôle de facilitateur pour la libération des virions à partir des cellules infectées. Cependant, la libération du virus est spécifique de certaines cellules, ce qui suggère que certaines cellules peuvent exprimer un facteur de restriction qui empêche la libération du virus en l'absence de *vpu* (56).

➤ **Le gène *nef* (negative expression factor)**

Il code pour une protéine très conservée de 24-32kd, et contribue à la pathogenèse du VIH à travers de multiples effets biologiques favorisant la réplication virale et l'infectivité (57). Le gène *nef* favorise l'infection virale par activation des lymphocytes T CD4 qui deviennent ainsi plus sensibles à l'infection (58). Il inhibe également l'expression des molécules responsables du pouvoir cytotoxique sur le VIH à la surface des cellules cytotoxiques ou naturel Killer (NK) (59).

2.3.4. Les LTR (pour long terminal repeat)

Ce sont des séquences d'ADN non-codantes composées de trois régions : U5, R, et U3. Les LTRs sont présents à l'extrémité du génome viral de tous les rétrovirus et sont impliqués dans l'initiation de la rétrotranscription et l'intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte (60).

2.4. Tropisme du VIH

Les cellules sensibles à l'infection par le VIH sont principalement celles qui expriment à leur surface le récepteur CD4⁺ et l'un des co-récepteurs CCR5 ou CXCR4 (61). Toute modification dans les préférences des corécepteurs, ainsi que l'efficacité et le mécanisme d'interaction entre le VIH-1 et le CCR5 et/ou le CXCR4 a une influence significative sur le tropisme viral, la progression de la maladie et la réponse aux antagonistes du corécepteur (62).

La découverte du VIH-1 fut rapidement suivie par la caractérisation de son principal récepteur cellulaire, le CD4. Celui-ci contient un site de liaison avec chacun des monomères de gp120. Ce récepteur s'exprime fortement sur les thymocytes et les lymphocytes T CD4⁺ matures, et plus faiblement sur les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules neuronales et les cellules gliales (63). Il agit aussi comme ligand pour le Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II (CMH II). Le CCR5 ou R5 et le CXCR4 ou R4, deux co-récepteurs de chimiokines, sont apparus, au milieu des années 90, comme des éléments clés du processus d'entrée virale. Il s'est avéré que ces co-récepteurs coopèrent avec le CD4 lors du processus de fusion. Bien que d'autres récepteurs de chimiokines aient également décrits, le CXCR4 et le CCR5 sont les plus utilisés. L'emploi préférentiel de l'un ou de l'autre des co-récepteurs détermine le tropisme des souches virales (X4, R5, X4R5). Les souches R5 infectent uniquement des cellules exprimant le CCR5 à leur surface, que sont les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules T CD4⁺ activées) tandis que les souches X4 ciblent et infectent exclusivement les cellules exprimant le CXCR4 (cellules T CD4⁺ naïves) (64). Une troisième

population virale désignée R5X4 ou double tropisme, est capable d'infecter à la fois les cellules exprimant soit le co-récepteur CCR5 soit le co-récepteur CXCR4 (65).

2.5. Cycle répliatif du VIH

Entre le moment de sa fixation sur la surface de la cellule cible et de son intégration dans le noyau cellulaire, le VIH est capable de détourner le fonctionnement de la cellule hôte pour se répliquer et assurer sa survie (66). Les étapes de la réplication du VIH sont illustrées à la figure 3.

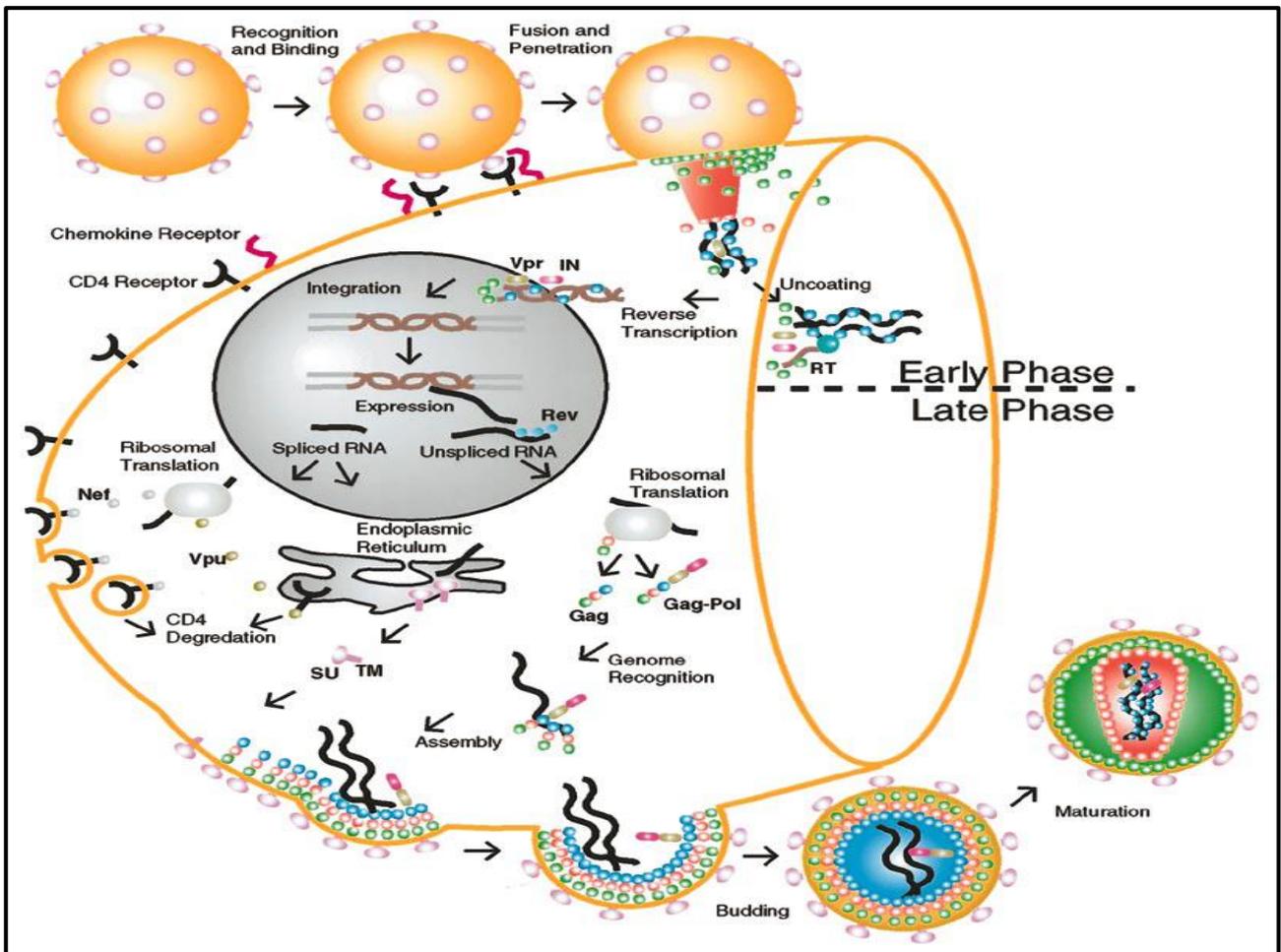


Figure 3 : Cycle de réplication du VIH-1 (26)

Le cycle de réplication est composé de plusieurs étapes pouvant être divisées en 2 phases : la phase précoce et la phase tardive.

2.5.1. La phase précoce

Elle commence depuis l'attachement du virus sur son récepteur spécifique jusqu'à l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire (26).

➤ La fixation ou attachement à une cellule

L'étape initiale du cycle de réplication du VIH-1 est l'attachement d'un virion à la surface d'une cellule cible (figure 4). Cette étape repose sur la reconnaissance entre les protéines de la surface virale (gp120) et les récepteurs CD4 de la cellule cible avec l'intervention de co-récepteurs dont les principaux sont CXCR4 et CCR5. La liaison du gp120 au récepteur CD4 et aux co-récepteurs entraîne des changements de conformation permettant au peptide de fusion de la gp41 de s'insérer dans la membrane de la cellule cible en formant un état de transition.

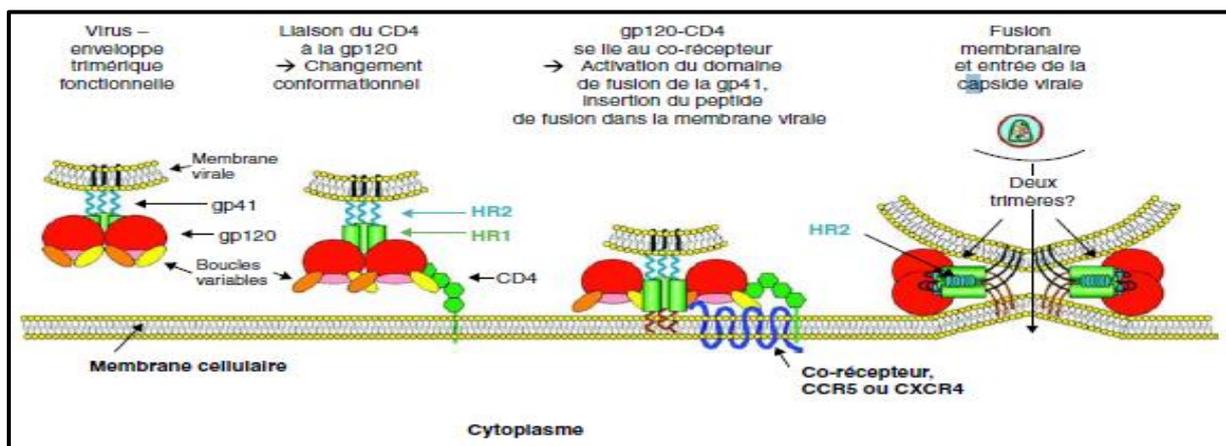


Figure 4 : Différentes phases de l'entrée du virus dans la cellule hôte (67).

➤ La fusion, la pénétration et la décapsidation

C'est la seconde étape de l'infection, qui intervient juste après l'union de la gp120 avec son co-récepteur, déclenchant de nouveaux changements de conformation dans le complexe protéique de l'enveloppe. Ces changements de conformation séquentiels mènent à terme la dissociation de la gp120 et la gp41. Ainsi l'insertion du peptide de fusion de la gp41 dans la membrane cellulaire entraîne la fusion des membranes (cellulaire et virale). La capsid du VIH pénètre alors dans le cytoplasme de la cellule où elle se désagrège, libérant les deux brins d'ARN et les enzymes qu'elle contient.

La protéine gp120 est responsable de l'attachement et la gp41 de la fusion puis de la pénétration au sein de la cellule (68).

➤ **La transcription inverse**

Cette étape est spécifique aux rétrovirus, convertissant leur ARN en ADN par transcription inverse sous l'effet d'une enzyme appelée transcriptase inverse (TI). Celle-ci parcourt l'ARN viral et le transcrit en une première molécule d'ADN simple brin (-). Pendant cette synthèse, l'ARN matrice est dégradé par une activité dite "RNase H" portée par la TI. La dégradation de l'ARN est totale sauf pour deux courtes séquences riches en purines appelées séquences Poly Purine Tracts (PPT). Ces deux courtes séquences vont servir d'amorces à la TI pour la synthèse du second brin d'ADN, le brin (+), en utilisant l'ADN brin (-) comme matrice. L'ADN final est une molécule bi-caténaire, appelée ADN à double brin (figure 5) (69).

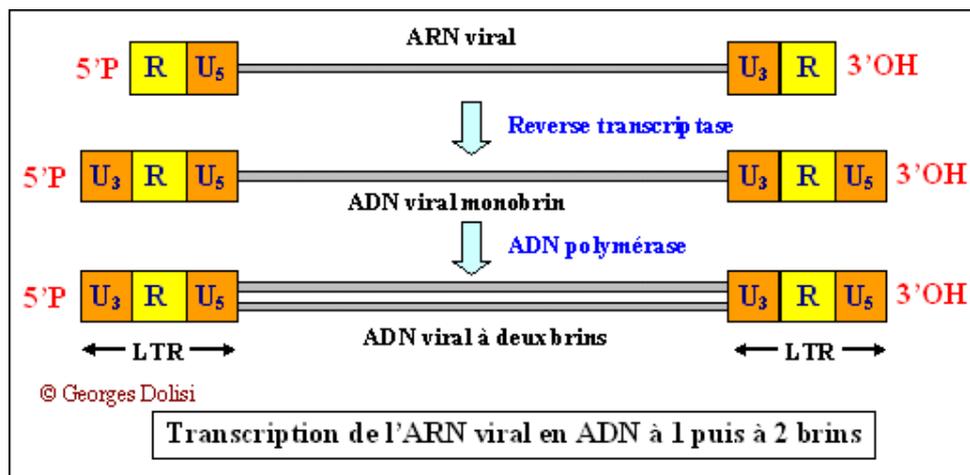


Figure 5 : Schéma de la transcription inverse de l'ARN viral

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

➤ **L'intégration de l'ADN viral**

L'ADN double brin obtenu après la transcription inverse, s'intègre dans le noyau cellulaire sous forme de complexe de pré-intégration (figure 6). Ce complexe possède

la capacité d'interagir avec des éléments de la membrane nucléaire pour la traverser et accéder à la chromatine cellulaire (70). Le virus est alors sous sa forme de provirus.

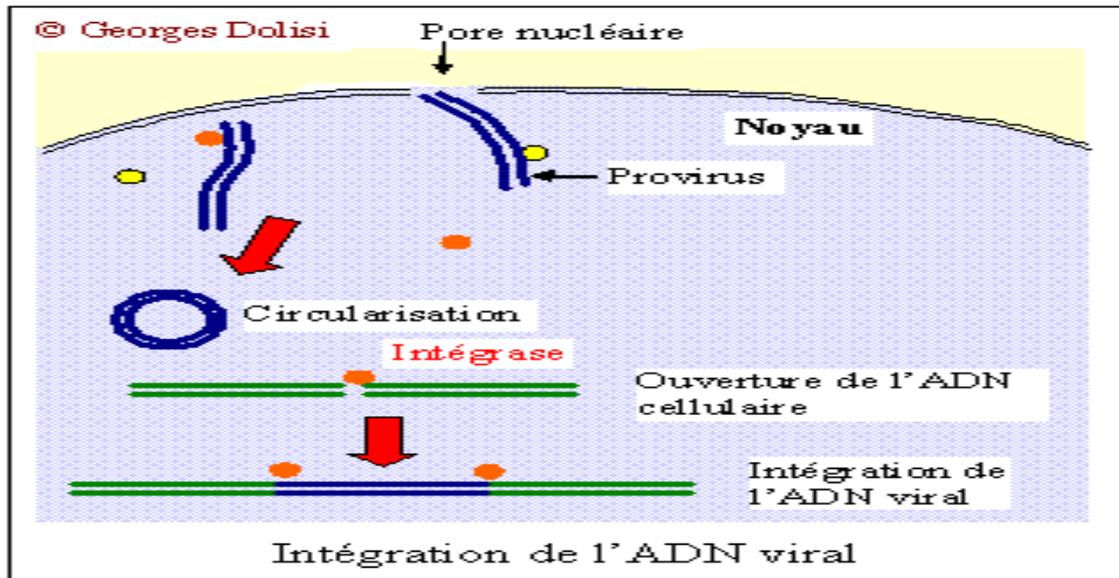


Figure 6 : Intégration de l'ADN virale dans le noyau cellulaire
([HTTP://GEORGES.DOLISI.FREE.FR/PHYSIOPATHOLOGIE/SIDA_INFECTION.HTM](http://georges.dolisi.free.fr/physiopathologie/sida_infection.htm))

2.5.2. La phase tardive

La phase tardive du cycle de la multiplication du VIH-1 correspond à la transcription, la maturation l'assemblage, le bourgeonnement, et à la libération de virus infectieux dans le milieu extracellulaire.

➤ La transcription de l'ADN viral en ARNm (messager)

Les deux brins d'ADN de la cellule s'écartent localement sous l'effet de l'ARN polymérase. Des bases azotées libres du noyau viennent prendre la complémentarité de la séquence et se polymérisent en une chaîne monobrin de type ARNm (Figure 7) (71).

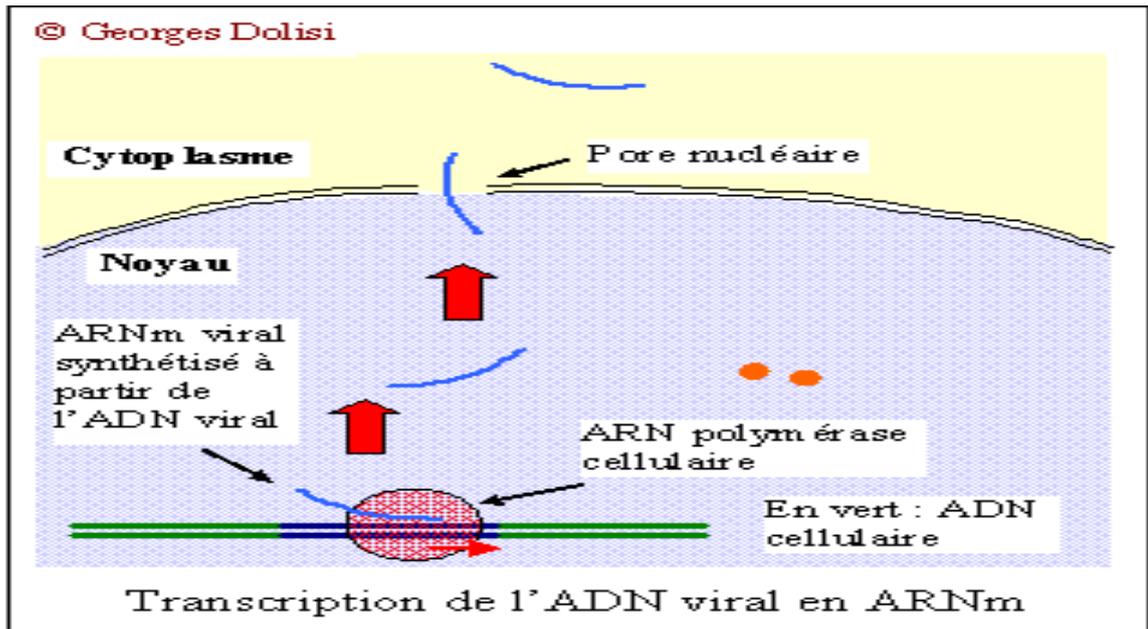


Figure 7 : Schéma de la transcription de l'ADN viral
 ([HTTP://GEORGES.DOLISI.FREE.FR/PHYSIOPATHOLOGIE/SIDA_INFECTION.HTM](http://georges.dolisi.free.fr/physiopathologie/sida_infection.htm))

➤ **La traduction de L'ARN**

Une fois sorti du noyau par l'un des pores nucléaires, l'ARNm est lu par les ribosomes du réticulum endoplasmique rugueux (RER). A chaque codon (groupe de trois nucléotides) de l'ARNm, le ribosome attribue un acide aminé. Les différents acides aminés se polymérisent au fur et à mesure de la lecture. Un codon initiateur Adénine-Uracile-Guanine (AUG) fera débiter la synthèse des polyprotéines qui doivent subir une maturation dans l'appareil de Golgi avant d'être opérationnels (72) (figure 8).

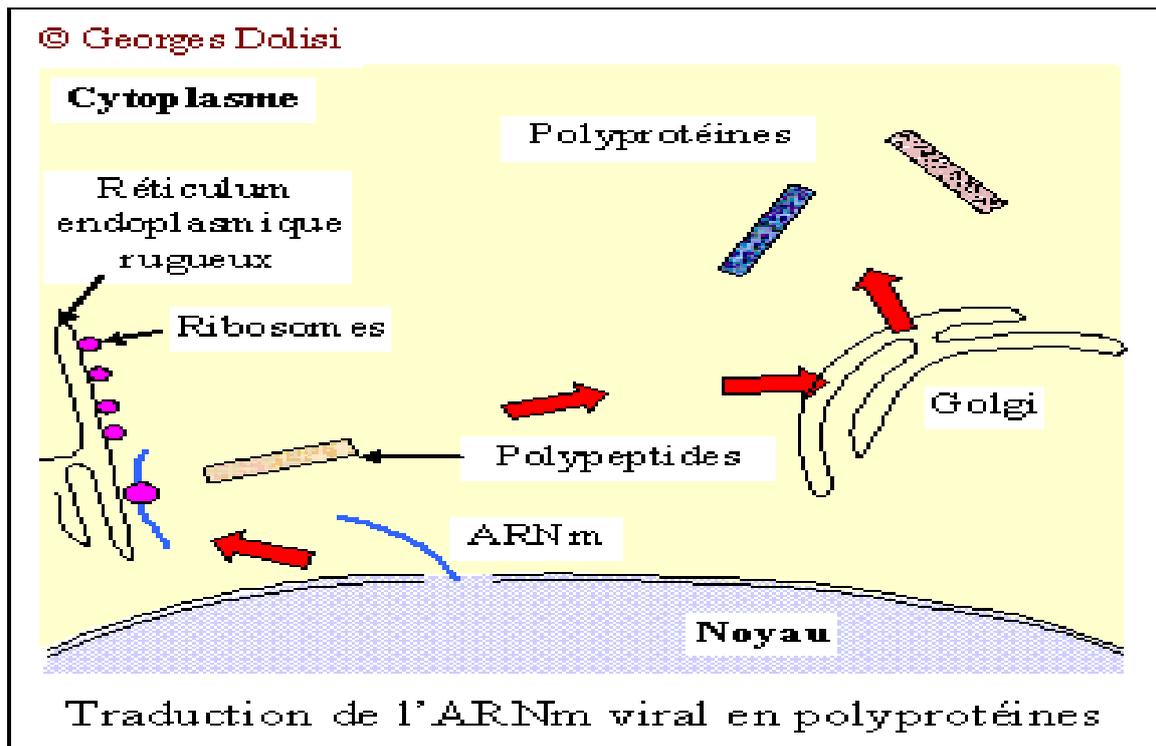


Figure 8 : Schéma de la traduction de l'ARNm
 ([HTTP://GEORGES.DOLISI.FREE.FR/PHYSIOPATHOLOGIE/SIDA_INFECTION.HTM](http://georges.dolisi.free.fr/physiopathologie/sida_infection.htm))

➤ **La maturation l'assemblage et le bourgeonnement**

L'étape de la maturation consiste à des épisodes de coupure des différentes polyprotéines de structure (matrice, capsidie et nucléocapsidie) en protéines matures. A la sortie du Golgi, ces protéines se lient entre elles et rejoignent les glycoprotéines virales membranaires puis les ARN viraux les rejoignent à leur tour pour former un nouveau virion qui seront par la suite libérés à travers la membrane cellulaire par bourgeonnement (73).

3. VARIABILITE GENETIQUE ET EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DU VIH

3.1. Variabilité génétique

Une des caractéristiques majeures du VIH est sa grande variabilité génétique. Celle-ci est liée à un taux de réplication virale élevé, à une absence de fonction correctrice de la TI, combiné à la survenue fréquente de mutations aléatoires et de recombinaisons génétiques (74). C'est au cours de la rétrotranscription du génome viral que la diversité génétique s'exprime le plus. L'environnement cellulaire a un effet majeur sur la rétrotranscription. Lors de cette phase, le taux de recombinaisons et les mutations sont déterminés par la présence ou non de protéines cellulaires et virales spécifiques et par l'abondance des substrats cellulaires (75).

Trois facteurs peuvent rendre compte de l'évolution de n'importe quelle partie d'un génome (viral ou cellulaire) et d'être à l'origine de cette variabilité génétique : le taux de mutations spontanées, le nombre de générations produites par unité de temps et enfin les pressions de sélection positives et négatives.

➤ Mutations aléatoires fréquentes

Le VIH se réplique à une vitesse très élevée en présence de la Transcriptase Inverse (TI) caractérisée par une faible fidélité, ce qui se traduit par un taux de mutations très important. Dépourvue de système de correction des erreurs de copie survenant au cours de la synthèse de l'ADNc, la TI La transcriptase inverse serait donc le principal facteur générateur de variabilité du génome viral (76).

La vitesse de réplication du génome est un facteur amplificateur de la survenue de ces mutations. En effet, ce sont environ 10 000 virions qui sont produits par jour par chaque virion infectant une cellule. Ainsi, suite à l'infection d'un individu, des essaims de nouveaux virus contenant des séquences génomiques différentes coexistent et sont continuellement produits à l'intérieur d'un même individu. Chez cet individu infecté, les variants peuvent diverger d'environ 1 à 5%. Cette variabilité

du génome viral touche tous les gènes, mais diffère d'un gène à un autre. C'est ainsi que le gène *env* est le plus variable et le gène *pol* le plus conservé (39).

➤ **Les recombinaisons génétiques**

Les recombinaisons génétiques s'effectuent lors de la réplication d'un virus et peut se faire entre des virus d'espèces différentes (recombinaison hétérologue) ou de même espèce (recombinaison homologue) (77).

Quand une cellule est infectée par 2 ou plusieurs virus génétiquement distincts, une recombinaison peut se produire pendant la rétrotranscription, lors des phénomènes de sauts de brins effectués par la TI. Le nouveau virus ainsi produit est un virus mosaïque constitué de séquences provenant de plusieurs génomes. Cette recombinaison peut être des virus d'un même sous-type (recombinaison intra sous-type) (78), ou des virus de sous-types différents (recombinaison inter sous-types) (79). L'existence de virus recombinants est la preuve systématique d'une double infection.

➤ **Les pressions de sélection**

Les pressions de sélection sont de deux types : négative et positive. Les pressions de sélection négatives sont responsables de mutations synonymes ou silencieuses. Ce type de mutation est le plus souvent rencontré sur les gènes sensibles de la particule virale tel que les gènes *pol* et *gag* qui codent respectivement pour les enzymes virales et les protéines de structure (80).

Par opposition, les pressions de sélection positives sont responsables de mutations non-synonymes. Ces mutations touchent de façon très marquée le gène *env* codant les protéines d'enveloppe, et plus particulièrement, la boucle V3, partie la plus variable de la gp120 (81).

3.2. Epidémiologie moléculaire du VIH

La diversité génétique constitue la base de la classification du virus. C'est ainsi que les deux types de VIH actuellement connus sont classés en groupes, sous-types, sous-

sous-types et enfin formes recombinantes uniques (URF) ou formes recombinants circulantes (CRF) (19) (tableau I).

Tableau I : Origine et épidémiologies moléculaires des VIH-1 et VIH-2 (82)

Groupes	Origine	Isolats (%)	Epidémiologie	Variants
VIH-1				
M	SIVcpz	98,2%	Tous les continents	Responsables de la pandémie Répartis en sous-types A-D, F-H, J et K Sous-sous-types A1-A5, F1-F2 58 CRF et nombreux URF
N	SIVcpz	0,4%	Afrique de l'Ouest et du Centre	Résistants naturellement aux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse
O	SIVgor	< 0,001%	Cameroun uniquement	Confinées au Cameroun
P	SIVgor	2 variants	Inconnue	Décrits chez 2 malades Camerounais
VIH-2				
A-H		1,4%	Principalement en Afrique de l'Ouest et du Centre	Résistants naturellement aux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse Un 9 ^{ème} groupe est décrit en 2013

Le VIH-1 est ainsi divisé en 4 groupes (**M**, **N**, **O** et **P**) dérivant chacun d'une introduction distincte d'un SIVcpz/SIVgor dans la population humaine (21) voir tableau 1. Il en est de même pour le VIH-2, dont l'ancêtre est le SIVsmm. Le VIH-2 proviendrait ainsi de transmissions indépendantes des virus de la lignée SIVsmm qui ont donné naissance au 9 groupes du VIH-2 (5, 6) voir tableau 1.

Le VIH-1 groupe O (Outlier) est le plus divergent et aurait pour origine des SIV infectant les gorilles (SIVgor) (3). L'épidémie à VIH-1 du groupe O est restreinte à la partie ouest de l'Afrique centrale notamment au Cameroun (83) et au Gabon (84).

Le groupe N a été identifié en 1998 et il aurait pour origine une lignée de SIVcpz retrouvée chez les chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes* de la partie centrale du Sud du Cameroun (85). En 2011, un cas de VIH groupe N fut diagnostiqué en France, chez un patient qui avait séjourné au Togo, ce qui suggère que les virus du groupe-N sont actuellement en circulation en dehors du Cameroun (86).

Le groupe P, décrit pour la première fois en 2009, chez une femme d'origine camerounaise (87) serait proche du SIVgor sans évidence de recombinaison avec les autres groupes du VIH-1. A ce jour, 2 cas ont été identifiés confirmant la circulation de ce variant qui pourrait exister à l'état latent au Cameroun (88).

Le VIH-1 groupe M est le seul responsable de la pandémie actuelle et représente plus de 98.2% des cas d'infection. Il compte 9 sous-types (A, B, C, D, F, G, H, J, K) et plus de 58 formes recombinantes (89). Ce groupe aurait pour origine les SIVcpzPtt des chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes* du sud-est du Cameroun (85). Il a atteint ensuite la République Démocratique du Congo avant de se propager dans le reste du monde (90).

4. TRANSMISSION ET PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFECTION A L'INFECTION A VIH

4.1. Modes de transmission du VIH

Le VIH est transmissible d'une personne infectée à une autre par exposition directe à des liquides organiques contaminés. On retrouve ce virus dans le sang, le sperme, les sécrétions vaginales et aussi dans le lait maternel <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/fr/>. Le virus peut aussi se retrouver dans la sueur et la salive mais, en faible quantité et le risque de transmission par ces liquides est considéré comme nul. De façon générale, il existe deux principales modes de transmission que sont : la transmission horizontale et la transmission verticale (<http://www.futura-sciences.com/magazines/sante/infos/dossiers/d/medecine-sida-vaincre-vih-1696/page/5/>).

4.1.1. La transmission horizontale

Les modes de transmission horizontale sont principalement de deux types : la transmission par voie sexuelle et la transmission par voie sanguine.

4.1.1.1. La transmission par voie sexuelle

A l'échelon mondial, 70 à 80% des cas de SIDA sont imputables à ce type de transmission. Celui-ci inclut les relations sexuelles orales, vaginales et anales entre partenaires homosexuels et bisexuels masculins ou hétérosexuels.

Cette transmission sexuelle du VIH requiert le passage du virus à travers les muqueuses (anorectale, cervico-vaginale, du prépuce ou de l'urètre) qui présente une certaine perméabilité vis-à-vis du VIH. Le risque d'acquisition de la maladie est accru si les épithéliums muqueux sont endommagés, particulièrement par d'autres maladies sexuellement transmissibles causant de l'inflammation et/ou des ulcérations (91).

4.1.1.2. La transmission par voie sanguine

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

4.1.2. La transmission verticale

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

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

4.2. Physiopathologie de l'infection à VIH

L'infection à VIH se manifeste principalement en trois phases : la phase de primo-infection, la phase asymptomatique et la phase chronique (voir figure 9).

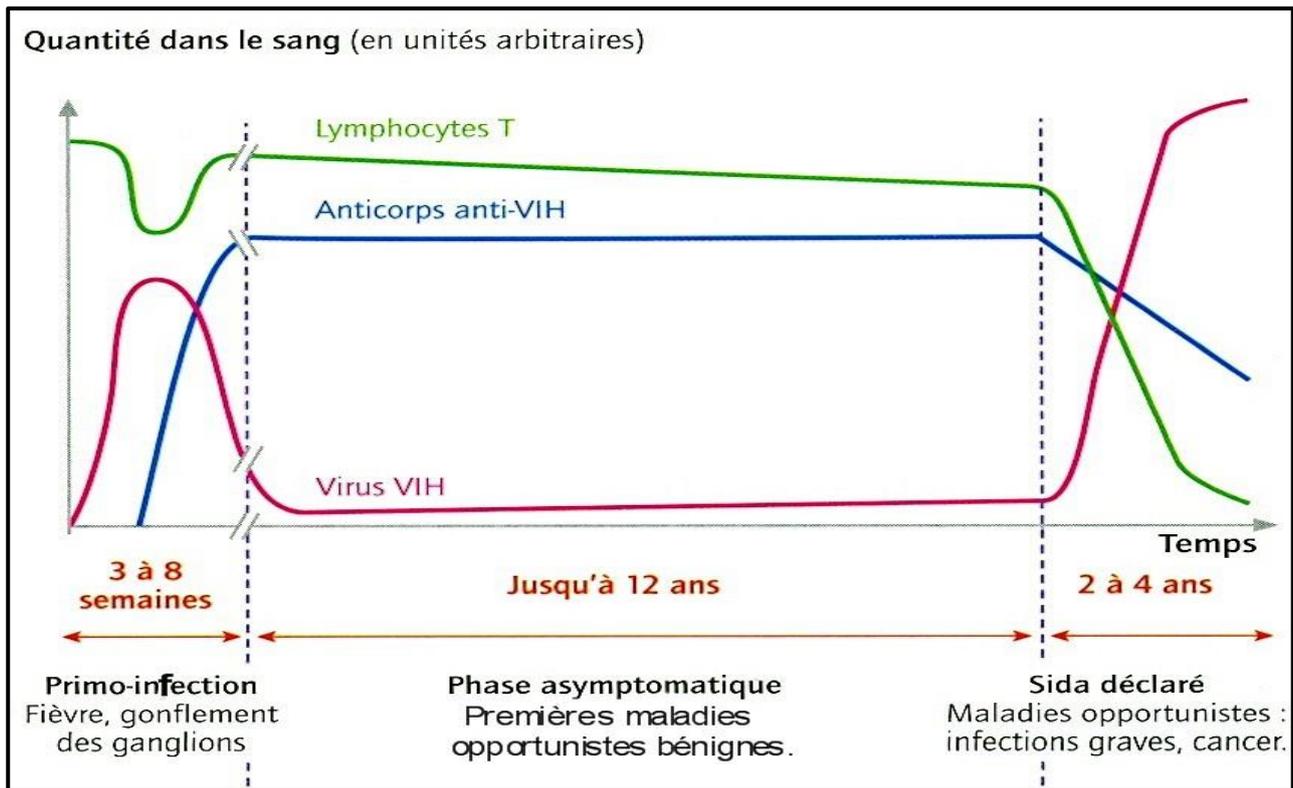


Figure 9 : Différentes phases de l'évolution d'une infection par le VIH

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

4.2.1. La primo-infection

Très vite après l'infection, le VIH se multiplie silencieusement dans l'organisme, atteint les nodules lymphatiques et stimule la réponse immunitaire (cellulaire et humorale). De plus en plus de cellules sont infectées et le virus est produit en très grande quantité (10^6 - 10^8 copies d'ARN par ml) accompagné d'une forte chute de globules blancs (leucopénie) en particulier les lymphocytes T CD4+ (92).

Pendant cette période silencieuse, survient une virémie plasmatique et parfois des manifestations cliniques (fièvre, éruptions cutanées, céphalées, asthénie) précèdent la séroconversion, c'est-à-dire l'apparition des anticorps (Ac), élaborés par le système immunitaire. Cette phase, caractérisée par une virémie massive, correspond au stade majeur des risques de transmission surtout sexuelle (http://social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/10_Primo_infection_par_le_VIH.pdf).

4.2.2. La phase asymptomatique

Elle suit la phase silencieuse et correspond à la période de latence clinique pouvant durer plusieurs années. Durant cette phase, le virus subit de nombreuses mutations et échappe au système immunitaire en continuant à se répliquer dans les organes lymphoïdes. On assiste à un déclin progressif et permanent du nombre et de la fonction des cellules T CD4+ ($2 \cdot 10^8$ cellules/jour). Ce déclin peut être dû à plusieurs facteurs : un effet cytopathique direct du virus, tel que la rupture de la membrane cellulaire lors de la libération des nouveaux virions et la formation de syncytia. Cette phase est caractérisée par la survenue de nombreuses maladies opportunistes (candidose, varicelle) (<http://www.arcas-sante.org/a/publi/infectionVIH/5infection.html>).

4.2.3. La phase chronique

C'est la phase agressive du VIH qui correspond à l'installation de la maladie (SIDA). La perte en nombre et en fonction des cellules T CD4+ entraîne une très forte diminution de la production de certaines cytokines telles que l'IL-2 et par conséquent, une baisse de l'activité anti-VIH des cellules CD8+. Un nombre faible de lymphocyte T CD4 (< 200 cellules/mm³) enclenche une infection des monocytes, les cellules dendritiques les cellules T CD8+, ce qui augmente davantage la charge virale. A ce stade, le système immunitaire devient déficient et les personnes infectées développent des infections opportunistes ou des tumeurs (Lymphome non-Hodgkinien ou Sarcome de Kaposi) (93).

5. PRISE EN CHARGE DE L'INFECTION A VIH

5.1. Diagnostic biologique du VIH

5.1.1. Le prélèvement

Plusieurs matrices de prélèvement peuvent être réalisées pour le diagnostic de l'infection à VIH.

5.1.1.2. Le prélèvement sanguin sur tube

Les tests de diagnostic de l'infection par le VIH s'effectuent classiquement sur un prélèvement de sang veineux effectué au pli du coude chez les adultes. Mais cette technique de prélèvement fait suite à de nombreuses contraintes (risque d'hémolyse, rupture de la chaîne de froid...) pour la prise en charge des PvVIH en milieu décentralisé. Pour pallier ces contraintes, des techniques de prélèvements alternatifs ont été développées.

5.1.1.2. Le prélèvement sanguin sur papier buvard

Le prélèvement sur papier buvard nécessite du matériel adapté et des conditions particulières. Les sites de prélèvement dépendent de l'âge et les tests à effectués (94).

- Chez les enfants de 18 mois et moins les sites sont : le gros orteil, le talon et le bout des doigts.
- Chez l'adulte le prélèvement se fait sur le bout des doigts
- Dans le cadre de certaines analyses comme la détermination de la charge virale du VIH le prélèvement se fait d'abord sur tubes EDTA puis transféré sur papier buvard à l'aide d'une pipette.

5.1.1.3. Le prélèvement des autres liquides biologiques

Dans le diagnostic biologique de l'infection par le VIH, outre le sang et ses dérivés (plasma et sérum) d'autres fluides corporels sont utilisés comme prélèvements alternatifs.

- **La salive** : il a été démontré l'existence d'anticorps anti-VIH au niveau de la salive de sujets infectés par le virus (95). Le grand défi à l'utilisation de ce fluide était son niveau d'IgG très bas en comparaison avec le sérum ou le plasma.
- **L'urine** : Même s'il a été démontré la présence d'anticorps anti-VIH dans ce fluide biologique, les faibles performances des tests urinaires, ont très tôt limité son utilisation pour le diagnostic de l'infection (96).

5.1.2. Les outils de diagnostic du VIH

Deux types de techniques sont utilisés : les techniques indirectes permettent la détection des anticorps et les techniques directes permettent la mise en évidence des virus.

5.1.2.1. Le diagnostic indirect

On distingue deux types de tests : les tests de dépistage et les tests de confirmation

➤ Les tests de dépistage

Ils sont basés sur la détection des anticorps anti-VIH (réaction Antigène/Anticorps). Ces tests sont effectués de façon systématique au cours des dons de sang depuis 1985 ou volontairement. On en distingue deux : les tests ELISA et les tests rapides.

Les tests ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) sont les tests utilisés comme référence pour le diagnostic de l'infection à VIH (97). Il existe plusieurs types d'ELISA dont, ELISA sandwich et ELISA combiné qui sont les plus utilisés. Le principe repose sur une réaction immuno-enzymatique consistant à la recherche d'anticorps anti-VIH du sujet à tester. Il s'agit de mettre en contact le sérum et les antigènes viraux spécifiques du VIH, fixés sur un support solide.

En dehors des tests d'ELISA, les tests rapides permettent aussi le dépistage de l'infection à VIH et sont réalisés généralement en moins de 30 min d'où leur appellation (tests rapides). Leurs antigènes utilisés sont de même nature que ceux utilisés pour les tests ELISA et détectent les mêmes types d'anticorps.

➤ **Les tests de confirmation**

Ce sont des tests utilisés en cas d'incertitude ou de positivité des tests d'ELISA ou des tests rapides. Le plus utilisé est le Western Blot (WB), c'est la technique de référence, et ayant l'avantage d'être sensible à toutes les protéines constitutives du virus, ce qui implique, une plus grande spécificité. Il consiste en la recherche des anticorps spécifiques dirigés contre les différentes protéines virales codées par les gènes de structure. Dans la plupart des cas, ce test confirme l'ELISA et met en évidence la réactivité de la plupart des protéines virales.

5.1.2.2. Le diagnostic direct

Réservé à des laboratoires spécialisés et situations particulières comme : la suspicion de primo-infection ou variants particuliers, le diagnostic du nouveau-né ou de primo-infection et des résultats de Western Blot indéterminé. Ce diagnostic peut se faire selon différents procédés

➤ **La mise en évidence du virus par isolement**

C'est une technique nécessitant un laboratoire de haute sécurité pour protéger le biologiste et les manipulations sur les risques de contamination.

Il s'agit d'une technique réalisée *in vitro* par co-culture des lymphocytes du sujet suspect d'infection avec des lymphocytes provenant d'un donneur séronégatif (sain). Le test est positif lorsqu'on obtient dans le milieu de croissance des hauts niveaux de transcriptase inverse virale ou de protéine p24 après au moins deux tests consécutifs (98).

➤ **La mise en évidence du génome viral**

Elle repose sur la détection des acides nucléiques viraux pouvant être quantitative ou qualitative. La détermination se fait par des techniques d'amplification génique.

La mise en évidence de l'ADN proviral du VIH repose sur l'utilisation de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). (<http://www.sante.dz/jmsida2014/guidenational.pdf> 2013).

➤ **La mise en évidence de la protéine p24 : Antigénémie p24**

La recherche de l'antigène p24 est une technique de diagnostic qui n'est détectable qu'aux 2 extrémités de l'infection : à la phase précoce c'est-à-dire avant la séroconversion et à la phase évolutive c'est-à-dire au stade SIDA. Elle est également recherchée chez le nouveau-né de mère séropositive (98).

5.2. Traitement de l'infection à VIH

L'infection à VIH a connu une véritable révolution thérapeutique depuis la prescription des traitements antirétroviraux. Certes, la bataille n'est pas gagnée car le virus n'est toujours pas éradiqué par ces antirétroviraux mais le pronostic de l'infection à VIH a changé depuis l'arrivée en 1996 du traitement généralement utilisé en association.

Les médicaments antirétroviraux permettent de contrecarrer de manière spécifique les différentes étapes du cycle de réplication (99). Selon les recommandations de l'OMS, une association minimale de 3 molécules antirétrovirales, serait efficace pour stopper la réplication virale (OMS, 2013).

5.2.1. Les molécules antirétrovirales

Ce sont des molécules qui interviennent au niveau des différentes étapes du cycle de réplication. Il existe plusieurs classes parmi lesquelles les inhibiteurs d'entrée et de fusion, les inhibiteurs de l'intégrase, les inhibiteurs de la transcriptase inverse et les inhibiteurs de la protéase.

5.2.1.1. Les inhibiteurs d'entrée et de fusion

Les inhibiteurs d'entrée et de fusion interviennent dans la phase initiale du cycle de réplication du VIH en empêchant l'interaction entre la cellule hôte (récepteur CD4) et les molécules d'entrée et de fusion du VIH (gp120 et gp41, CCR5 et/ou CXCR4). La fixation de ces inhibiteurs à leurs cibles entraîne un changement de conformation qui aura comme conséquence l'inhibition de l'entrée du génome viral dans la cellule hôte (100).

5.2.1.2. Les inhibiteurs de l'Intégrase

Ils interviennent de manière sélective dans le transfert de l'ADN viral par fixation sur le complexe de pré-intégration. Il en résulte alors un blocage du processus d'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte **(101)**.

5.2.1.3. Les inhibiteurs de la transcriptase inverse

Les inhibiteurs de la transcriptase inverse sont subdivisés en deux classes ayant toutes les deux une action inhibitrice sur le processus de rétro transcription de l'ARN viral en ADN complémentaire. Il s'agit des inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la TI (INTIs) et des inhibiteurs non nucléosidiques de la TI (INNTIs) **(102)**.

➤ Les inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la Transcriptase inverse (INTI)

Ce sont les premières classes de molécules antirétrovirales à être développées et commercialisées comme thérapie antirétrovirale **(103)**. Les INTIs sont des analogues aux nucléosides naturels, à la seule différence qu'ils leur manquent le groupe hydroxyle (-OH) en 3'. Ces molécules deviennent actives à la suite d'une triphosphorylation et agissent en compétition avec les nucléosides naturels pour entraîner un arrêt de l'élongation de la chaîne d'ADN **(104)**. Le tenofovir (TDF) est la seule molécule active et rapide de cette classe car ne nécessite que deux phosphorylations.

➤ Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI)

Les INNTI sont des inhibiteurs n'agissant pas par compétition. Ils agissent directement au niveau d'une poche hydrophobe distincte mais proche du site actif de l'enzyme au niveau de la sous-unité p66.

Les INNTI sont des composés hautement actifs sur le VIH-1, mais ils restent inefficaces sur le VIH-2 et le VIH-1 groupe O du fait d'une résistance naturelle **(105)**.

5.2.1.4. Les Inhibiteurs de la protéase (IP)

L'étape finale de la maturation des virions implique une protéase virale qui clive le précurseur Gag-Pol en des unités fonctionnelles, ce qui fait de cette protéase une cible potentielle pour un traitement.(106). Les IP inhibe le clivage protéolytique en occupant le site actif de la protéase avec une haute affinité et bloque ainsi l'activité de l'enzyme. Ceci aboutit à la genèse de particules virales non infectieuses (107).

Toute fois le traitement aux antirétroviraux est basé sur un choix défini par l'OMS associant 3 molécules pour assurer l'efficacité du traitement.

5.2.2. Le choix thérapeutique (OMS, 2015)

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

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

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

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

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

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

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

5.3. Quantification du VIH ou charge virale

5.3.1. Définition

La charge virale du VIH est la quantité de virus (nombre de virus) circulant dans les liquides corporels notamment le plasma, le sang total, le lait maternel et les sécrétions vaginales d'une personne infectée par le virus. Plus la charge virale est élevée, plus le risque de transmission du VIH augmente. La CV permet de suivre l'efficacité d'un TARV lorsque celui-ci est initié. Un traitement ARV bien mené doit faire baisser la charge virale à un niveau « indétectable », ce qui permet de réduire considérablement le risque de transmission du VIH (OMS 2013).

Pour le VIH-1 les marqueurs utilisés pour la quantification sont l'ARN viral et l'ADN proviral. Dans le plasma le marqueur utilisé est l'ARN du fait de la présence des virus libres tandis que dans le sang total, l'ARN et/ou l'ADN proviral peuvent être quantifiés du fait de la présence non seulement du virus libre dans la composante plasmatique mais aussi du génome viral intégré dans les cellules sanguines (lymphocytes, monocytes) (108).

5.3.2. Les techniques de quantification du VIH-1

L'apparition de techniques d'amplification des acides nucléiques a permis le développement de plusieurs technologies de plateforme de CV. Actuellement, sur le marché, plusieurs trousse commerciales utilise le principe d'une amplification en temps réel ; CobasTaqMan[®] (Roche Molecular Diagnostics), Real Time HIV-1[®] (Abbott Diagnostics) ou NASBA (Biomérieux) et Generic HIV Charge virale[®] (Biocentric) (109).

- **Cobas Amplicor (CAP) cobas TaqMan (CTM)[®] (Roche Molecular Diagnostics)**

Il détecte et quantifie l'ARN des sous types du VIH-1 du groupe M, O et plusieurs CRFs au niveau du gène gag et de la région LTR. Ce test combine l'extraction automatisée de l'ADN à une étape d'amplification-détection (109).

- **Real Time HIV-1[®] (Abbott)**

Il détecte et quantifie les sous-types du groupe M, N, O, P et plusieurs CRFs et cible la région Pol Intégrase. C'est une technique entièrement automatisée et la détection se fait à l'aide de sonde marquée partiellement double brin (109).

- **Generic HIV Charge virale[®] (Biocentric)**

Il détecte et quantifie l'ARN du VIH-1 du groupe M, sous types A à H et plusieurs CRFs au niveau des régions gag LTR. Son extraction est manuel avec le Qiagen spin column (QIAamp Viral RNA Mini Kit, Qiagen, Courtaboeuf, France) ou automatisée, Nordiag (Biocentric, Bandol, France) et l'amplification peut se faire sur

l'automate PRISM 7300 (Applied BioSystems, Foster City, CA, USA) car c'est un système ouvert (109).

- **NucliSensEasyQ v2.0[®] (Biomérieux)**

NucliSENS EasyQ v2.0 effectue une amplification isothermique de type NASBA couplé à une détection en temps réel et son extraction utilise le principe de la technique de Boom grâce à de particules de silice magnétique ajoutées au lysat. Cette technologie détecte et quantifier l'ARN des sous types du VIH-1 du groupe M et plusieurs CRFs au niveau de la région *gag* (109).

Ces différentes plateformes permettent de déterminer la CV qui est un outil indispensable pour la prise en charge des patients infectés par le VIH sous TARV. En effet le suivi régulier de la CV permet d'obtenir un diagnostic direct du succès ou de l'échec du traitement.

5.4. Prise en charge des enfants infectés par le VIH

L'infection à VIH chez les enfants constitue un réel problème de santé publique surtout dans les pays à ressources limitées. Malgré les efforts consentis pour lutter contre la transmission verticale, il y a encore des enfants qui naissent infectés par le VIH. A cela, s'ajoute un nombre important d'adolescent infecté par voie sexuelle et sanguine. Aujourd'hui, avec l'accès aux TARV on a pu constater qu'un enfant traité est le plus souvent dans une situation asymptomatique parfaitement stable lui permettant de grandir harmonieusement et d'arriver à l'âge adulte en bonne santé. Mais cet accès au TARV pour tous, demeure un défi majeur et un enjeu stratégique de la lutte contre cette pandémie. Un défi majeur car certaines molécules restent inabordables pour la grande majorité des enfants infectés en Afrique. Un enjeu stratégique car traiter permet de réduire la mortalité mais permet aussi d'agir sur l'incidence de la maladie en diminuant le nombre de nouvelles contaminations, notamment par la réduction du risque de transmission mère-enfant. Selon les dernières statistiques, en 2014, sur les 36.9 millions de PVVIH dans le monde, 41% [38%-46%] de l'ensemble des adultes avaient accès au traitement, contre 23% [21%-

24%] en 2010. Pour ce qui est des enfants, 32% [30%-34%] avaient accès au traitement en 2014, contre 14% [13%-15%] en 2010. Il a été remarqué une diminution du nombre de décès de causes liées au SIDA chez les enfants, et cela est lié à une augmentation des services de PTME et à une amélioration de la prise en charge des enfants infectés (7).

Une prophylaxie antirétrovirale fournie aux femmes enceintes vivant avec le VIH a permis la prévention de l'infection à VIH. En 2014, 73% [68%-79%] de ces femmes avaient accès aux médicaments antirétroviraux pour prévenir la transmission du VIH à leurs bébés. Il faut aussi noter que les nouvelles infections à VIH parmi les enfants ont chuté de 58% entre 2000 et 2014 (7).

En Afrique subsaharienne il y a eu 190000 [170 000–230 000] nouvelles infections à VIH parmi les enfants en 2014 et depuis 2009, une diminution de 48% des nouvelles infections à VIH parmi les enfants est enregistrée.

Au Sénégal en 2014, un nombre total de 44000 [37,000 - 53,000] vivaient avec le VIH parmi lesquels 3,700 [3,100 - 4,400] enfant (7). Cette situation épidémiologique reflète l'expansion des services de PEC des enfants infectés par le VIH.

5.4.1. Le diagnostic de l'infection par le VIH chez l'enfant selon l'OMS 2013

Les tests utilisés pour le diagnostic de l'infection par le VIH varient en fonction de l'âge des enfants.

➤ Le diagnostic chez l'enfant âge de 18 mois et plus

Pour cette tranche d'âge, les méthodes de diagnostic sont les mêmes que chez l'adulte, s'agissant de faire deux tests rapides sur deux prélèvements différents.

Si les deux tests sont positifs, l'enfant est supposé infecté. Dans ce cas un TARV est rapidement initié si son âge est inférieur à 5 ans.

Si le résultat est négatif, l'enfant n'est donc pas infecté et cela suppose que l'option B+ a été appliquée chez la mère depuis la grossesse. Cette option consiste à mettre en route un TARV à vie chez toutes les femmes enceintes ou allaitantes.

➤ **Le diagnostic chez l'enfant âgé de moins de 18 mois**

Pour ces enfants, seuls les tests virologiques permettent de faire le diagnostic de l'infection comme les techniques d'amplification génomique (détection ARN ou ADN virale) et les techniques immunologiques directes (détection antigène p24).

Si la PCR est positive, l'enfant est considéré comme infecté mais le test est refait pour confirmer le résultat.

Si la PCR est négative et que le nourrisson n'a jamais été allaité, il est alors considéré comme non infecté.

Pour les enfants infectés, le suivi biologique est instauré suivant des paramètres et modalités selon l'OMS.

5.4.2. Le suivi biologique de l'infection

Le monitoring biologique permet de suivre l'efficacité thérapeutique et de mettre en évidence d'éventuels effets secondaires des traitements.

➤ **Les modalités de suivi**

Les modalités de suivi des enfants selon les recommandations de l'OMS 2015 (http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/206448/1/9789241509893_fre.pdf) sont recensées dans le tableau IV.

Tableau IV : Modalités du suivi biologique chez l'enfant (OMS 2015)

	Suivi sans ARV	Bilan pré-thérapeutique	J15	M1	M6	M12	M18	M24 puis tous les six mois
CD4	Chaque 6 mois	oui			oui	oui	oui	oui
Charge virale		Si possible		Si possible	Si possible	oui		oui
NFS	Si possible	oui		(4)	oui	oui	(4)	oui
Transaminases		oui	(3)		oui	oui	(3)	oui
Protéinurie		(1)			(1)	(1)	(1)	(1)
Créatinine		(1)				(1)		(1)
Bilan lipidique		si possible				(2)		(2)

(1) si ténofovir (TDF) ou pathologie rénale sous-jacente

(2) si Inhibiteur de protéase ou efavirenz (EFV)

(3) si névirapine (NVP) ou médicament hépatotoxique au long cours

(4) si zidovudine (AZT)

➤ **L'intérêt du bilan pré-thérapeutique**

Avant la mise en route d'un traitement, certaines molécules sont à éviter dans certaines situations.

- AZT en cas d'anémie,
- NVP si transaminases augmentées,
- TDF en cas de pathologie rénale ;

Le bilan pré-thérapeutique est parfois payant et les parents tardent à le réaliser. S'il existe une indication « urgente », il faut envisager de débiter les ARV sans attendre les résultats du bilan.

➤ **L'intérêt du bilan de suivi**

Le bilan de suivi consiste toujours à vérifier l'efficacité du traitement ARV par la détermination du taux de CD4 et de la CV. Il permet également de s'assurer de l'absence d'effets secondaires ou il faut modifier le traitement. En cas de mauvaise réponse immunologique ou virologique, un contrôle doit être réalisé 3 mois plus tard, après renforcement de l'observance et adaptation éventuelle des posologies des ARV.

5.4.3. Le traitement ARV chez l'enfant

5.4.3.1. Les indications du traitement ARV chez l'enfant selon l'OMS 2015

Un traitement ARV, bien administré, permet à l'enfant un développement physique et cognitif normal jusqu'à l'âge adulte. Ce traitement doit être initié chez tout enfant ou adolescent infecté par le VIH, quels que soient son taux de lymphocytes CD4 et son état clinique. Mais il est initié en priorité dans les cas suivant :

- tous les enfants de moins de 2 ans,
- les enfants de moins de 5 ans au stade clinique 3 ou 4; ou si $CD4 < 750/mm^3$; ou si $CD4 < 25\%$,
- les enfants de plus de 5 ans et les adolescents au stade clinique 3 ou 4 ; ou si $CD4 < 350/mm^3$.

5.4.3.2. Les principales molécules disponibles chez l'enfant

Elles sont identiques à celles de l'adulte et différenciées par classe selon le rapport sur les recommandations de l'OMS 2015:

- Inhibiteurs Nucléosidiques (et Nucléotidiques) de la Transcriptase Inverse (INTI) :
 - Zidovudine (AZT), Lamivudine (3TC), Didanosine (DDI) Ténofovir (TDF), Abacavir (ABC) ;
- Inhibiteurs Non-Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse (INNTI) :
 - Névirapine (NVP), Efavirenz (EFV), Etravirine (ETR) ;

- Inhibiteurs de la Protéase (IP) boostée : (1)
 - Lopinavir/ritonavir (LPV/r), Atazanavir/ritonavir (ATV/r), Darunavir/ritonavir (DRV/r);
- Inhibiteurs de l'intégrase :
 - Raltégravir (RAL), Dolutégravir (DTG)

5.4.3.3 Le protocole de traitement de 1^{ère} ligne chez l'enfant

Selon les recommandations de l'OMS 2013, il existe 3 protocoles de traitement en fonction de l'âge : avant 3 ans, entre 3 et 10 ans et après 10 ans (voir tableau V).

Tableau V: Schéma thérapeutique de 1^{ère} ligne chez l'enfant (OMS 2013)

Régime préféré de 1 ^{ère} ligne				Régimes alternatifs de 1 ^{ère} ligne					
Enfants de moins de 3 ans									
INTI	+	INTI	+	IP boosté	INTI	+	INTI	+	INNTI
ABC (ou AZT)	+	3TC	+	LPV/r	ABC (ou AZT)	+	3TC	+	NVP
Enfants de 3 à 10 ans									
INTI	+	INTI	+	INNTI	INTI	+	INTI	+	INNTI
ABC	+	3TC	+	EFV	ABC (ou AZT)	+	3TC	+	NVP
					AZT	+	3TC	+	EFV
Adolescents 10 à 19 ans									
INTI	+	INTI	+	INNTI	INTI	+	INTI	+	INNTI
TDF *	+	3TC (ou FTC)	+	EFV	TDF (ou ABC)	+	3TC (ou FTC)	+	DTG
					TDF (ou ABC)	+	3TC (ou FTC)	+	EFV400
					TDF (ou ABC)	+	3TC (ou FTC)	+	NVP

5.4.4. L'échec thérapeutique

Selon les critères de l'OMS, l'échec thérapeutique est défini comme étant une mauvaise réponse à un traitement antirétroviral de plus de 6 mois. Cette échec est d'abord virologique, puis immunologique et enfin clinique. Sur le plan virologique, l'échec peut être primaire ou secondaire.

- L'échec primaire qui se définit par la persistance d'une charge virale plasmatique détectable 6 mois après l'instauration du premier traitement ARV.
- L'échec secondaire correspond à un rebond de la charge virale plasmatique au-dessus du seuil de détectabilité après une période de succès virologique, sur deux prélèvements consécutifs.

➤ Les critères de l'échec thérapeutique

L'échec thérapeutique s'articule sur trois critères fondamentaux. Un échec virologique lorsque la Charge virale $> 1\ 000$ copies/ml, un échec immunologique lorsque le taux de CD4 est inférieur à 200 cellules/mm³ chez l'enfant de moins de 5 ans et inférieur à 100 cellules/mm³ chez l'enfant de plus de 5 ans et enfin l'échec clinique lorsqu'il y a passage d'un état clinique à un état plus avancé vers le SIDA (figure 10).

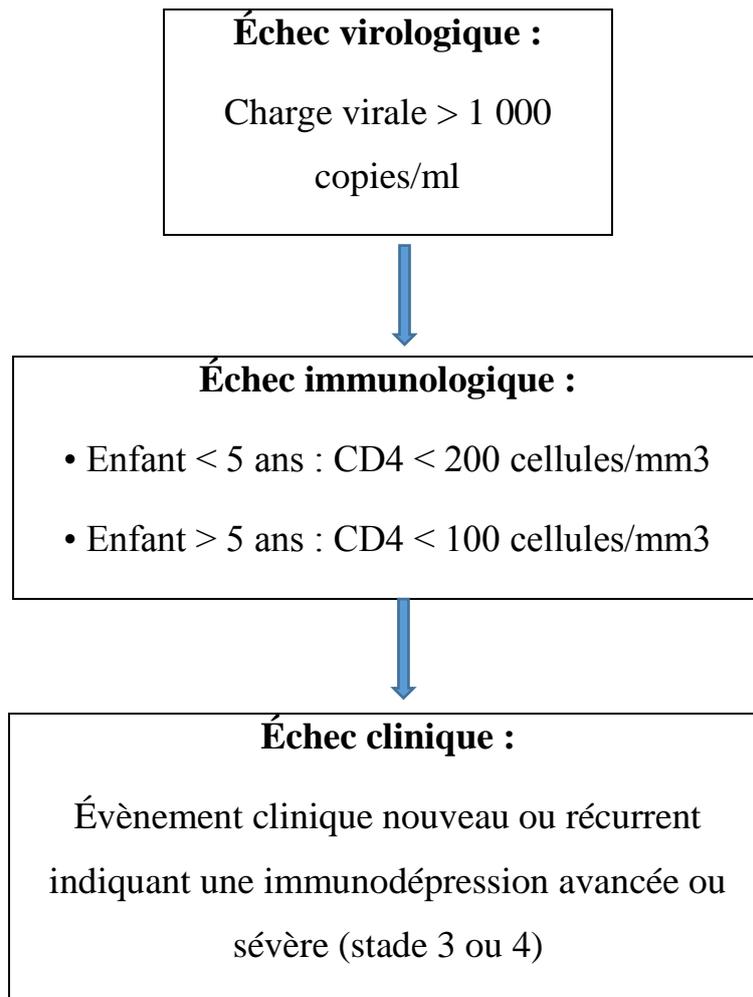


Figure 10 : Echec thérapeutique chez les enfants, OMS 2015

Pour tout patient étant en échec, une conduite a été recommandée par l’OMS suivant que l’échec est immunologique, virologique ou clinique. Nous présentons ci-dessous la conduite à suivre en cas d’échec virologique.

➤ **La Conduite à tenir devant une CV élevée**

Lors d’une suspicion d’échec thérapeutique après la mesure de la CV et qu’elle est supérieure à 1000 copies/ml, une deuxième mesure de CV est effectuée après 3 à 6 mois. Si celle-ci est $\leq 1\ 000$ copies/ml, le traitement précédent est continué et si elle est $> 1\ 000$ copies/ml, le traitement précédent doit être changé (figure 11) (http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/206448/1/9789241509893_fre.pdf)

Mais avant tout changement de ligne de traitement, il faut :

- s’assurer d’abord que le traitement précédent a été réellement pris,

- interroger également le parent sur la façon d'administrer le traitement à l'enfant ou interroger directement l'enfant en dehors de la présence du parent,
- reprendre l'éducation thérapeutique et avancer le processus d'annonce.

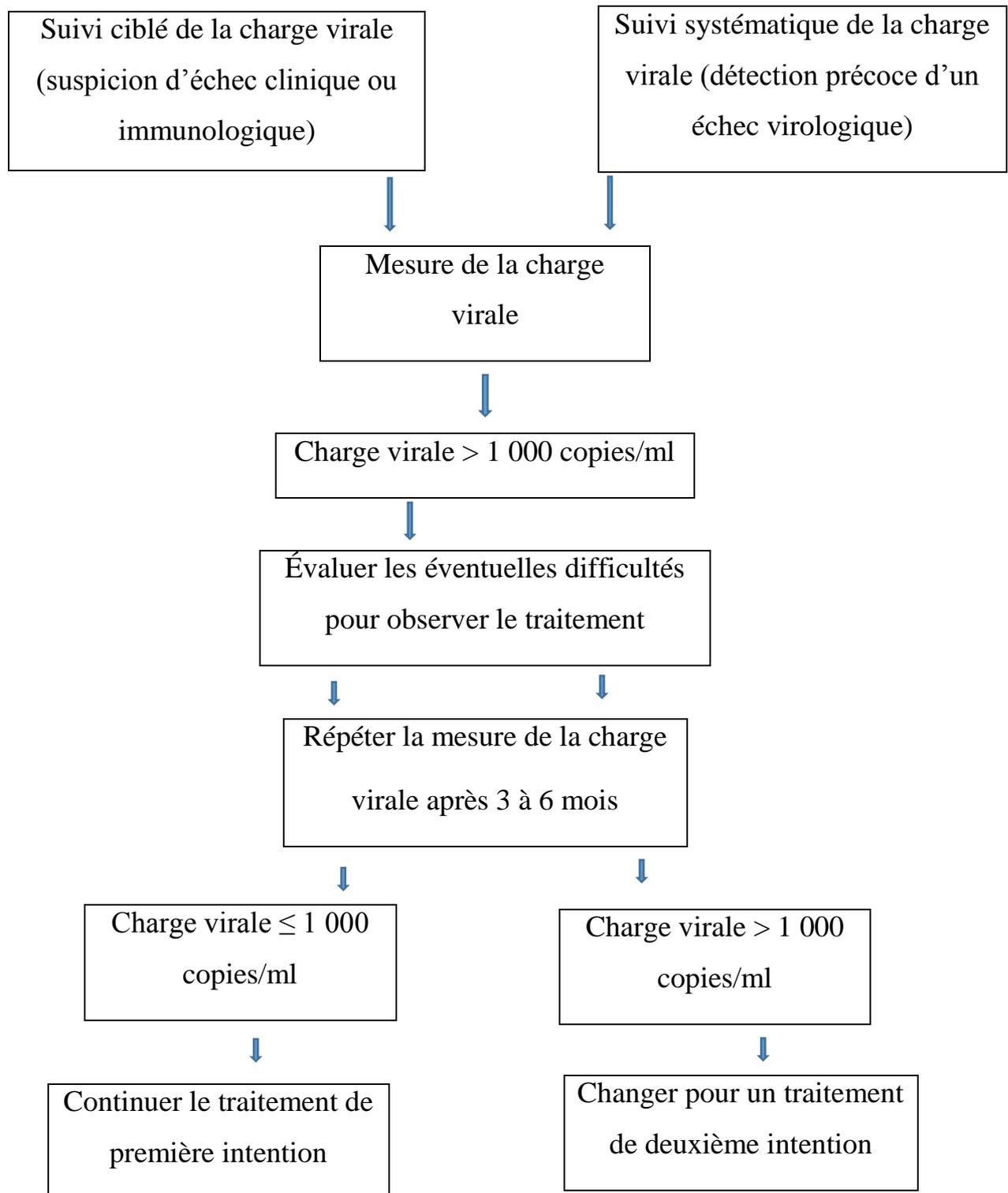


Figure 11 : Conduite à tenir en cas d'échec virologique, OMS 2013

➤ **Le choix et schéma thérapeutique de 2^{ème} ligne selon L’OMS**

Le choix thérapeutiques d’une 2^{ème} ligne est adapté en fonction de la 1^{ère} ligne et de l’âge des enfants. Le tableau ci-dessous (tableau VI) a été réalisé à partir des recommandations de l’OMS en 2015.

Tableau VI : Schéma thérapeutique chez l'enfant

	Traitement de 1 ^{re} ligne	Traitement de 2 ^e ligne	Traitement de 3 ^e ligne
Enfants	2 INTI + LPV/r	Si moins de 3 ans : 2 INTI + RAL	DTG + 2 INTI
		Si plus de 3 ans : 2 INTI + (EFV ou RAL)	DRV/r + 2 INTI
	2 INTI + EFV	2 INTI + ATV/r ou LPV/r	DRV/r + DTG +/- 1-2 INTI

INTI : Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse

LPV/r : Lopinavir/ritonavir

EFV : Efavirenz

RAL: raltegravir

DTG: Dolutegravir

DRV: Darunavir

6. UTILITE DU PAPIER BUVARD DANS LE MONITORING VIROLOGIQUE

Le papier buvard est un papier poreux capable d'absorber par capillarité une quantité de liquide. Le prélèvement sur papier buvard (DBS) est une approche simple et efficace ayant été utilisé dans le diagnostic de nombreuses maladies. Depuis les années 1960, il a été utilisé pour l'étude de plusieurs pathologies chez les nourrissons (110). Au fil du temps le DBS a été utilisé non seulement pour collecter le sang des nourrissons mais également celui des adultes à des fins d'analyses sérologiques (111) ou moléculaires (112) ainsi que dans le suivi virologique des PVVIH (Personnes Vivant avec le VIH) (113). C'est une méthode de prélèvement facile, souple et moins coûteuse pour la mise en œuvre des programmes d'étude du VIH dans les pays à ressources limitées. Elle trouve son application dans les études de séroprévalence, de détermination de la transmission mère enfant du VIH, de la détermination de la charge virale, des tests de génotypage et de résistance aux antirétroviraux.

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

6.1. Propriétés du papier buvard

Le papier buvard doit présenter certaines propriétés (voir figure 12)

- la surface doit être lisse et résistante, sans fibre perdue ;

- doit être résistant aux acides et bases fortes ;
- doit avoir une composition en cendre (extrêmement faible) (0,006%) ;
- être fabriqué à partir de linters de coton et de cellulose ;
- doit avoir une certaine capacité de rétention et une résistante accrue à l'humidité.

6.2. Les avantages du papier buvard

L'utilisation du papier buvard présente de nombreux avantages :

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



Figure 12 : Photographie de papier buvard

DEUXIEME PARTIE

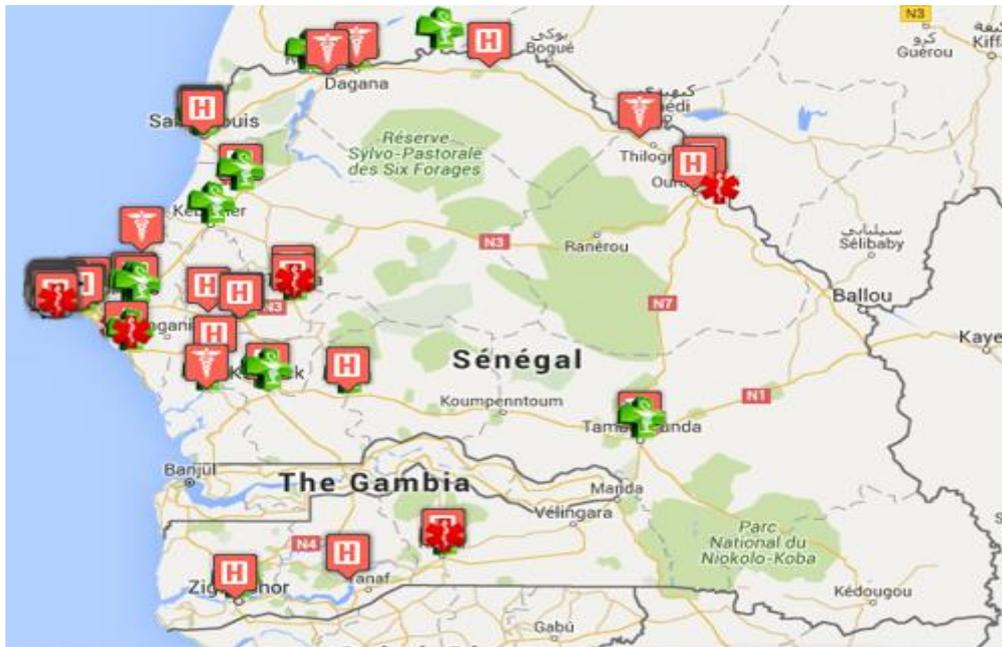
TRAVAIL EXPERIMENTAL

DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL

1. CONTEXTE, JUSTIFICATIFS ET CADRE D'ETUDE

1.1. Contexte et Justificatifs de l'étude

Pays Soudano-Sahélien en voie de développement, le Sénégal est situé dans l'extrême ouest du continent Africain et compte environ 14,13 millions d'habitants répartis dans 14 régions dont Dakar la capitale. C'est un pays avec un système de santé sous forme de pyramide à 3 niveaux avec un total de 3 084 structures de santé dont 86 hôpitaux, 242 centres de santé, 1 250 postes de santé et 1 506 cases de santé (figure 13). Outre ces structures publiques, le système de santé du Sénégal comprend aussi des cabinets médicaux privés, des cliniques privées, des cabinets para médicaux privés et des postes de santé privés ([http:// www. ansd. sn/ ressources/ publications/ RAPPORT préliminaire Sénégal ECPSS 2015.pdf](http://www.ansd.sn/ressources/publications/RAPPORT_preliminaire_Senegal_ECPSS_2015.pdf)).



Hôpital Centre de santé Poste de santé

Figure 13 : Carte des structures sanitaires du Sénégal
(<http://www.sendocteur.com/carte.php>.)

Au Sénégal, ces deux dernières décennies ont été marquées par une amélioration du système sanitaire grâce un renforcement du plateau technique au niveau des structures de santé et un élargissement des programmes de santé. Ainsi, la prise en charge thérapeutique des personnes vivant avec le VIH au Sénégal a été améliorée avec l'instauration du programme ISAARV depuis en 1998 **(114)**. Selon les recommandations de l'OMS (2015), cette prise en charge thérapeutique doit être accompagnée par un suivi biologique et plus particulièrement par un monitoring virologique. Ce dernier se résume par une quantification de la charge virale, une étude des mutations de résistance et de la diversité génétique du VIH chez les personnes infectées. Des études qui ont été réalisées au niveau de la capitale du Sénégal (Dakar), ont montré un taux d'échec virologique élevé (> 60%) chez les enfants **(115)** comme chez les adultes **(116)** accompagné par une grande diversité génétique des souche de VIH **(115, 117)**. En outre, Diouara et collaborateurs ont documenté, chez les adultes en milieu décentralisé, un taux d'échec virologique relativement élevé (24%) et un fort taux de résistance aux ARV (78%) et une diversité génétique marquée par la prédominance du CRF02_AG (62%) **(118)**. Le taux d'échec virologique élevé chez les enfants suivis au niveau de la capitale du Sénégal, amène à se demander sur la situation en termes de d'échec/efficacité virologique chez les enfants en milieu décentralisé, où les conditions de prise en charge ne sont pas remplies. La situation des enfants vivant avec le VIH en milieu décentralisé reste mal connue. Il n'existe pas de données sur la prise en charge thérapeutique ainsi que sur le monitoring virologique pour ces enfants en zones décentralisées. C'est ainsi qu'une collaboration Nord-Sud entre des chercheurs de l'IRD et du CRCF d'une part, et ceux du LBV de l'hôpital Aristide le Dantec (HALD) d'autre part, ont contribué à la mise en place d'un projet dénommé EnPRISE. Ce dernier avait comme objectif l'évaluation de la prise en charge pédiatrique du VIH (thérapeutique et virologique) en milieu décentralisé. La prise en charge des adultes comme des enfants dans ces zones a été facilité par l'utilisation de DBS comme support de prélèvement. Ce dernier a depuis lors été confectionné grâce

à une micropipette calibrée. Le projet EnPRISE, souhaitant inclure des enfants infectés dans toutes les régions décentralisées du Sénégal, pourrait être confrontée à une difficulté de confection des DBS car la micropipette n'est toujours pas disponible dans les laboratoires en zones reculées et/ou n'est pas toujours calibrée. C'est ainsi que, nous avons jugé nécessaire d'étudier l'utilisation d'un autre outil pour la confection des DBS, qui est la pipette pasteur (pipette pasteur à bout fin, référence 222c). Cet outil pourrait être un bon alternatif à la micropipette car plus accessible, simple d'utilisation, moins coûteux. C'est ainsi que ce travail a pour but d'évaluer l'intérêt de la pipette pasteur dans la confection des DBS pour le suivi virologique des enfants infectés par le VIH en milieu décentralisé du Sénégal.

1.2. Cadre de l'étude

Les prélèvements ont été réalisés dans toutes les structures de PEC pédiatrique situées dans les régions du Sénégal, excepté celle de Dakar. Ainsi, nous avons effectué les prélèvements en trois temps selon trois axes (Nord, Sud et Centre). L'axe nord regroupe 18 structures de PEC pédiatrique réparties dans 3 régions (Louga, Matam et St-Louis). L'axe centre regroupe 32 structures réparties dans 5 régions (Fatick, Diourbel, Thiès, Kaffrine et Kaolack). L'axe sud regroupe 22 structures qui sont également réparties dans 5 régions (Kédougou, Tambacounda, Sédhiou, Ziguinchor et Kolda). La partie analytique telle que la mesure de la CV a été effectuée dans l'unité de biologie moléculaire du Laboratoire de Bactériologie et de Virologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec (LBV-HALD).

L'unité de Biologie Moléculaire du LBV-HALD est le laboratoire de référence pour la prise en charge des personnes vivantes avec le VIH (PvVIH) au Sénégal. L'unité de Biologie Moléculaire est une parmi les unités techniques du laboratoire de Bactériologie Virologie du Centre Hospitalo-Universitaire Le Dantec de Dakar (CHU Le Dantec). Ce laboratoire a pour vocation le diagnostic biologique des infections bactériennes et virales, la recherche et la formation dans les domaines de la bactériologie et de la virologie. Il est également un centre de référence des IST et un

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

2. METHODOLOGIE

2.1. Echantillonnage

Le travail de notre étude a été conçu en deux phases : l'évaluation de la pipette pasteur comme outil de confection des DBS et la détermination du taux d'échec virologique chez tous les enfants inclus dans le projet.

- La première phase a porté sur l'évaluation de la pipette pasteur consistant à confectionner des DBS en parallèle avec la micropipette calibrée et la pipette pasteur. Pour chaque prélèvement de sang, une carte de DBS a été confectionnée en remplissant les 5 cercles avec 50 µl grâce à la micropipette (DBSµP), considérée comme outil de référence et d'un autre côté, les cercles ont été remplis en déposant 3 gouttes de sang grâce à la pipette pasteur (DBSPP). Les prélèvements ont été collectés chez les enfants suivis dans les cinq sites suivants : CHR Louga, CHR Kaolack, CHR Ziguinchor, CS Ziguinchor, CS Bignona

- La seconde phase consistait à déterminer le taux d'échec virologique chez les enfants recrutés dans le cadre de l'étude EnPRISE. Elle a été effectuée après la validation de la pipette pasteur comme outil alternatif à la micropipette.

2.1.1. Matériels de prélèvement et de confection des DBS

➤ Matériel pour le prélèvement de sang veineux

Le prélèvement sur papier buvard est précédé par un prélèvement sur tube par ponction veineuse. La figure 14 montre la liste des éléments nécessaire au prélèvement de sang veineux sur tube EDTA.



Gants sans talc
A



Tampon
alcoolisé
B



Aiguille de
prélèvement 22G
C



Tube EDTA
D



Curseur
E



Compresse
F

Figure 14 (A à F) : Matériel de prélèvement sur tube EDTA

➤ Matériel pour la confection des DBS

Pour confectionner les DBS, il faut disposer des éléments suivants (figure 15).



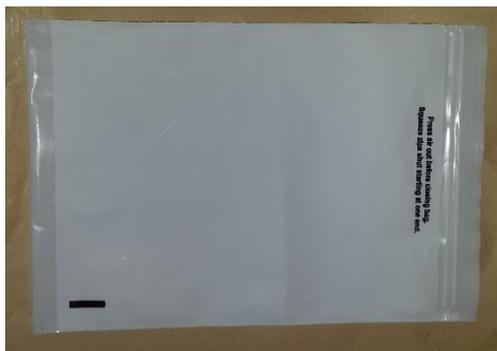
2 Cartes de DBS, chacune dans un sachet scellable

A



Pipette pasteur à bout fin référence 222c

B



Un grand Sachet en plastique scellable

C



Un petit sachet contenant 3 dessicants

D

Figure 15 (A à C) : Matériel d'un kit de DBS

Les pipettes pasteurs en plastique jetable, communément appelés Pipettes de transfert, sont des produits essentiels largement utilisés par les hôpitaux, la recherche et les laboratoires industriels pour transférer des liquides et des échantillons cliniques au cours des tests de diagnostic ou de recherche analytique. Ces pipettes sont idéales pour le transfert et la distribution de liquides en toute sécurité dans tous les types de laboratoires. Ce sont des outils en polyéthylène à basse densité non toxiques et peuvent être incinérés. En outre, les

pipettes peuvent être thermo soudées et congelé à très basse température, jusqu'à -70 ° C. La ligne de pipettes enveloppées stériles est emballée dans du papier de qualité médicale et film plastique. Une large gamme de pipettes de type standard et spécial est disponible <http://www.medicalexpo.fr/prod/copan-italia/product-68105-634009.html>. Dans cette gamme de pipette, nous pouvons citer la pipette de transfert 222c COPAN/Italie qui a servi d'outil pour notre étude.

2.1.2. Confection, acheminement et stockage des DBS

Trois voyages ont été effectués en trois temps espacés d'un mois dans les trois axes ou les médiateurs jouaient un rôle fondamental dans la distribution des kits de papiers buvard et la collecte des échantillons. Ils utilisaient les voitures de transport en commun pour une distribution rapide des kits dans les différents sites concernés.

Aux laboratoires, les cartes de DBS ont été confectionnées à partir des prélèvements de sang veineux sur tube EDTA. Selon les phases de l'étude les échantillons de DBS ont été confectionnés d'une part, en utilisant la micropipette et la pipette pasteur (phase 1) et d'autre part, en utilisant la pipette pasteur seule (phase 2). Une fois que tous les cercles imprimés sur le papier buvard requis sont remplis, il est séché pendant 24h heures à température ambiante sur une surface ou portoir non absorbants, non poussiéreux et à l'abri de la lumière. Le temps de séchage est très important car l'humidité résiduelle favorise le développement de bactéries ou de moisissures et peut modifier l'étape d'extraction. Au terme des 24h, les DBS ont été emballés dans du papier glycine et conservées dans des sachets en plastique scellable accompagnés de dessiccants et d'une carte témoin d'humidité pendant au maximum 15 jours (voir figure 16).

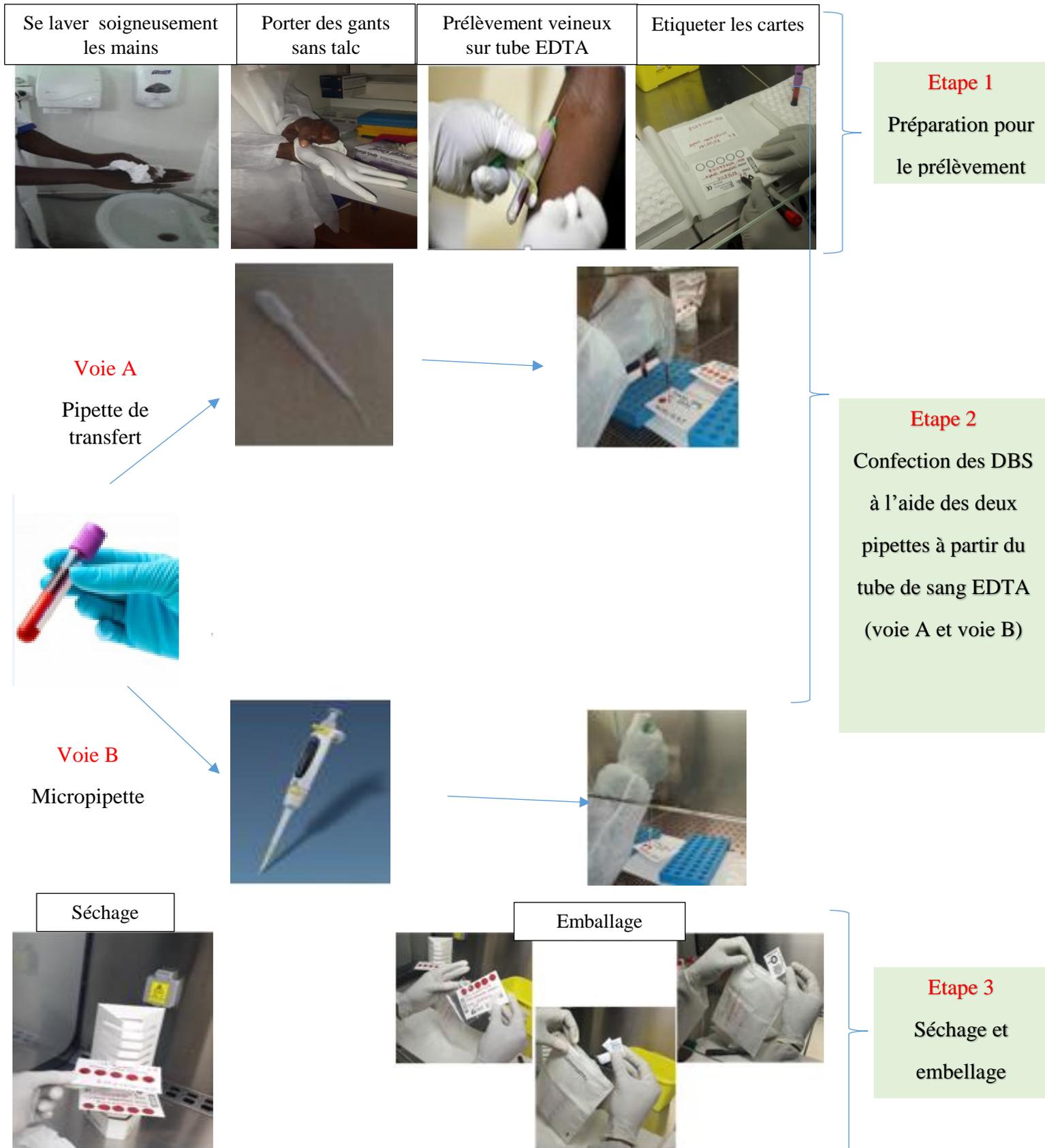


Figure 16: Prélèvement sur tube et les étapes de la confection des DBS

Après emballage, les DBS ont été acheminés au LBV-HALD par transport en commun pour effectuer les analyses de charge virale (voir figure 17). Une vérification de la conformité des bulletins de demande d'analyses et la conformité des prélèvements a été faite par le réceptionniste. Tout prélèvement ayant répondu au critère de conformité a été conservés à -80°C jusqu'à son utilisation.

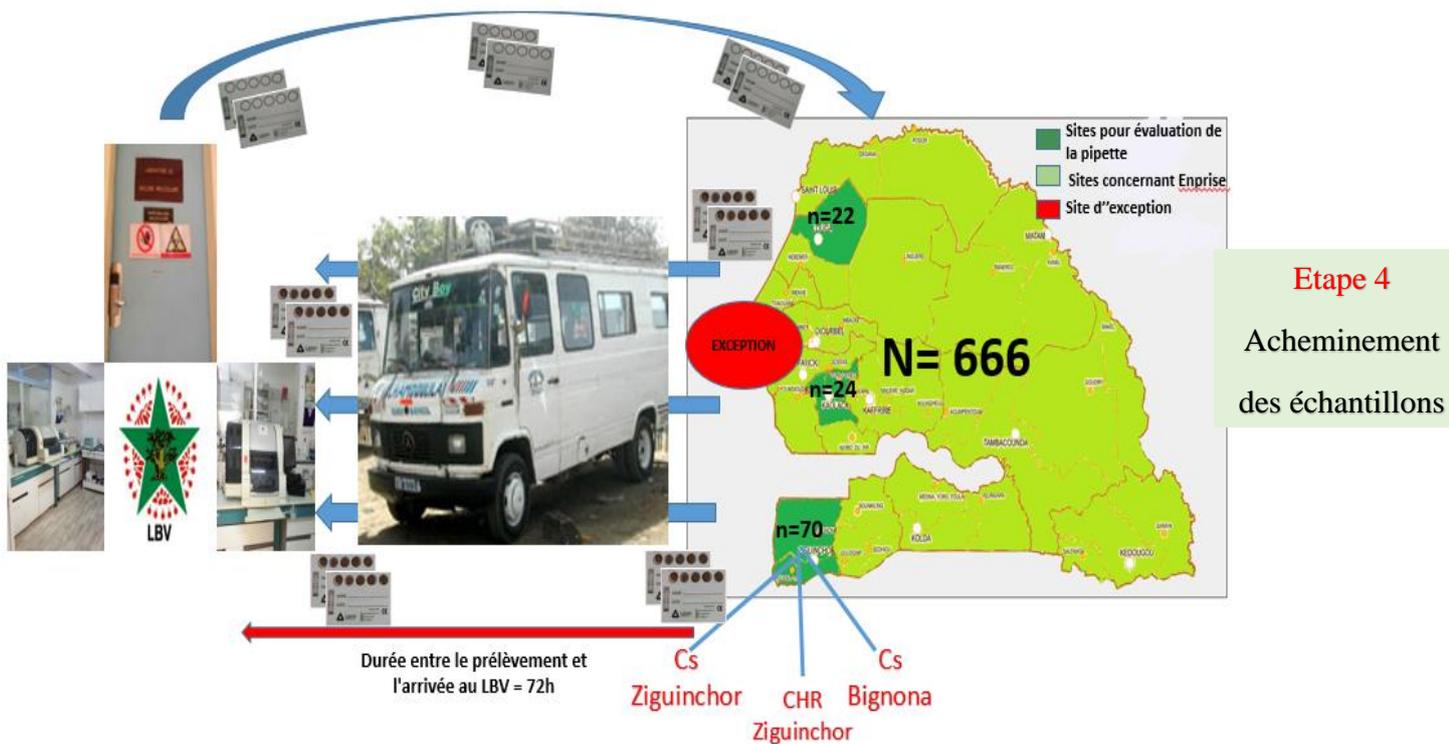


Figure 17 : Sites de prélèvement et moyen d'acheminement des échantillons

2.4. Approche analytique

La technologie utilisée pour cette étude afin de documenter les données de charge virale est celle de NucliSENS des laboratoires de Biomérieux. C'est une plateforme quantification de CV utilisant un extracteur (miniMag) ou l'EasyMag et un amplificateur (EasyQ).

2.4.1. Les matériels et réactifs d'extraction et d'amplification de l'ARN du VIH à partir de DBS par la technologie NucliSENS EasyQ HIV-1 V 2.0

➤ Matériels

Le NucliSENS des laboratoires de Biomérieux est une plateforme fermée où tous les matériels sont interdépendants à la réalisation d'une analyse (figure 18)



Figure 18 : Equipement du NucliSENS v.2.0

➤ Réactifs d'extraction

- Les tubes de lyse contenant 2ml de Lysis Buffer ;
- Les tampons de lavage : NucliSENS EasyMAG Buffer 1, 2 et 3 ;
- La silice magnétique NucliSENS EasyMAG ;
- Le contrôle interne et le diluant NucliSENS EasyMAG ;

Kit Nuclisens Mini
MAG et Easy MAG
HIV-1V 2.0

➤ Réactifs d'amplification

- Les enzymes (EnzII) ;
- Le diluant d'enzymes (Enzdil H) ;
- Les amorces (PRM H) ;
- Le diluant d'amorce (PRMdil H).

Kit Nuclisens EasyQ HIV-1V 2.0

2.4.2. L'extraction des acides nucléiques (ARN du VIH) par NucliSENS EasyMag ou MiniMag

L'extraction des acides nucléiques a été réalisée soit par l'extracteur semi-automatique miniMAG soit par l'extracteur automatique easyMAG avec l'utilisation de la silice selon la Chimie de BOOM[®].

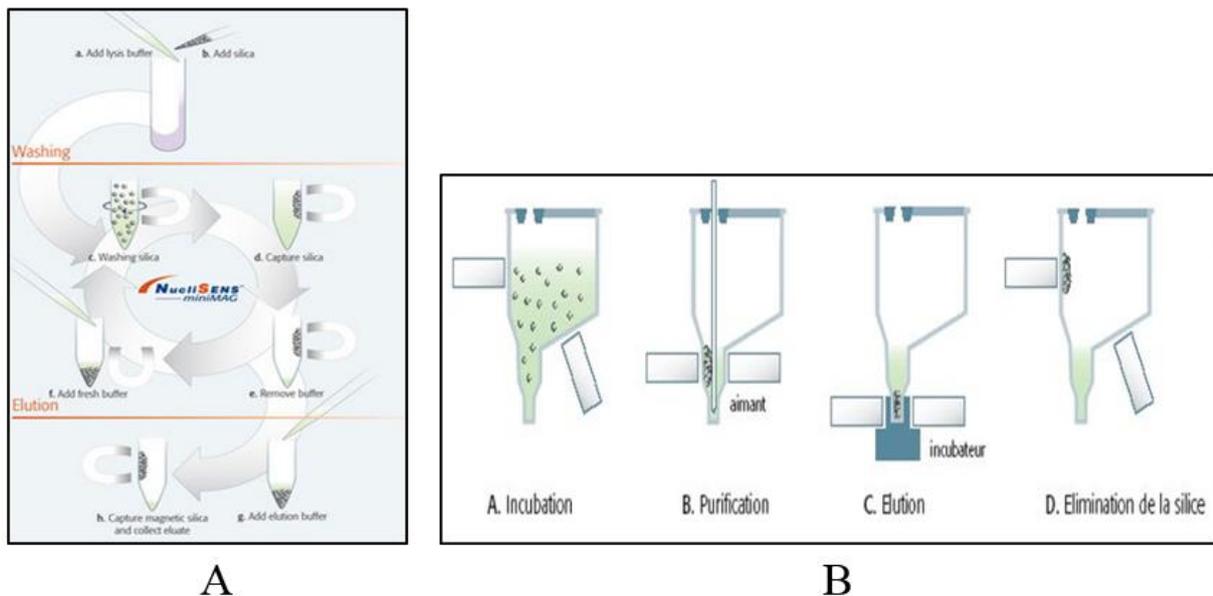


Figure 19 : Principe d'extraction automatisée sur miniMAG (A) et automatisée sur easyMAG (B) (<http://www.biomerieux.ch>)

Les échantillons ont d'abord été lysés et les acides nucléiques obtenus sont capturés par les particules de silice magnétique. Le système d'aimantation permet le lavage dynamique puis la fixation de la silice magnétique afin de purifier les acides nucléiques. L'étape de chauffage libère les acides nucléiques fixés sur la silice. Lors de l'étape finale, la silice magnétique est séparée de l'éluât par le système d'aimantation (voir figure 19).

2.4.3. L'amplification et la détection par la technologie NucliSENS EasyQ HIV-1 V2.0

➤ L'Amplification

La réaction d'amplification sur NucliSENS EasyQ est du type NASBA. C'est une amplification des séquences d'acides nucléiques ciblées à une température isotherme de 41°C. Elle est couplée à une détection en temps réel grâce à l'utilisation de balise moléculaires.

Les différentes étapes de l'amplification sont détaillées à la figure 20

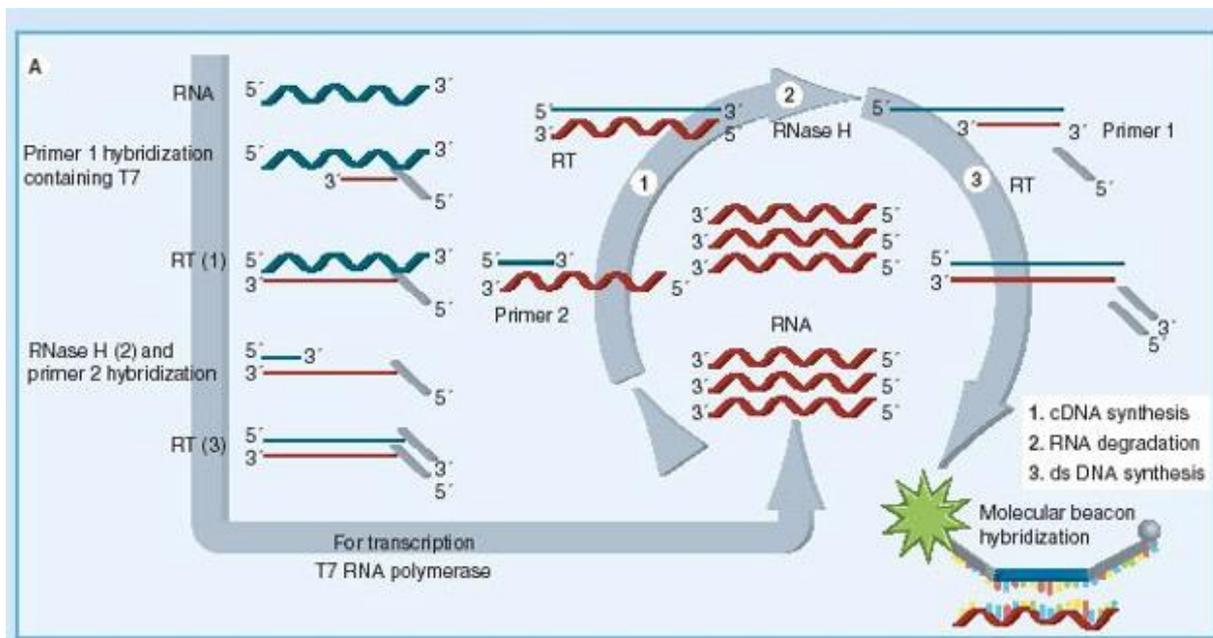


Figure 20 : Principe de la réaction d'amplification par NASBA

(<http://www.biomerieux-diagnostics.com/nuclisens-easyqr>)

Au cours des premiers stades de la réaction, une copie d'ADN de la zone cible est générée par l'extension du primer 1 par l'activité de la RT. La RNase H hydrolyse l'ARN de départ et la RT synthétise le second brin ADN à partir du primer 2. L'ADN double brin résultant code, pour un ARN polymérase T7, promoteur fonctionnel à l'extrémité 5'. L'ARN polymérase T7 se lie au promoteur et génère l'ARN antisens de la molécule cible. Chaque nouvelle molécule d'ARN est maintenant disponible en tant que modèle pour la RT dans la «phase cyclique» du processus d'amplification NASBA.

Dans cette phase, le primer 2 se lie au premier modèle, résultant en un simple brin d'ADNc copie à travers les activités coordonnées de RT et RNase H. Après fixation ultérieure du primer 1, le promoteur T7 devient double brin (ADNc) par 5'-extention du primer 1. L'ARN polymérase T7 peut désormais générer à nouveau des copies d'ARN qui peut être utilisé comme modèle. Le produit final NASBA se compose donc de copies simple brin d'ARN antisens représentant la zone ciblée par les amorces.

(119).

➤ La détection

Le processus de détection du test NucliSENS EasyQ[®] HIV-1 v2.0 utilise des balises moléculaires spécifiques de la cible (figure 21A).

Une balise moléculaire est un oligonucléotide d'ADN spécifique à la séquence d'ARN cible particulière, couplée à un fluorophore et à un quencher (figure 21B).

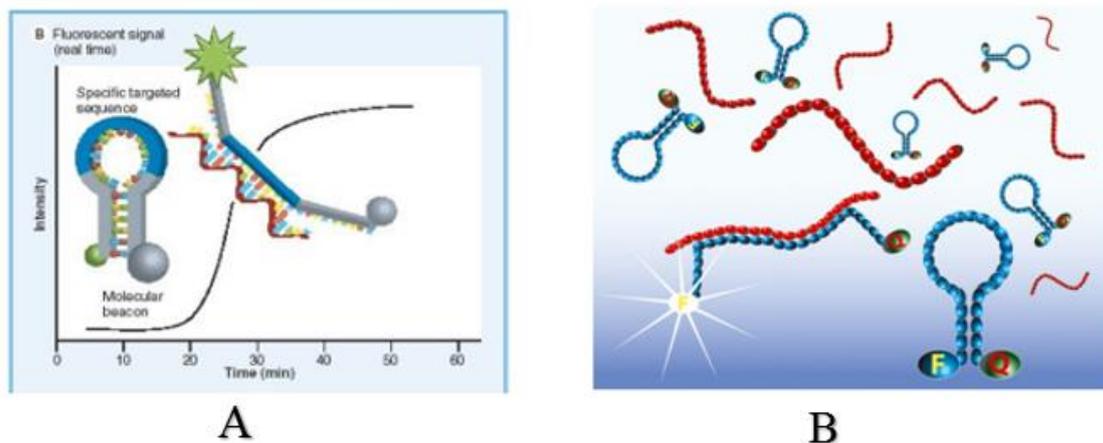


Figure 21 : Schéma d'une balise moléculaire (A) et son action sur l'ARN (B)

(http://www.medscape.com/viewarticle/585223_2)

Lors de l'hybridation de la balise moléculaire à la séquence cible, la balise s'ouvre et le fluorophore se sépare du quencher permettant ainsi une émission de fluorescence, qui augmente en fonction de la quantité d'ARN figure 21B.

La charge virale peut alors être mesurée à l'aide d'un algorithme de réduction des données dans le logiciel de test NucliSENS EasyQ[®] HIV-1 v2.0.

2.5. Analyse statistique des données

Les données ont été saisies dans le tableur Excel (Microsoft Office Excel 2013). L'analyse des résultats a été faite après transformation des valeurs absolues de CV en valeur logarithmique décimale. Une différence de log inférieure à 0,5 est considérée comme non significative.

La comparaison des résultats de charge virale à partir de DBS confectionnés avec la micropipette et la pipette pasteur, a été effectuée en utilisant le logiciel MethVal. Ce dernier a permis d'obtenir les tracés de la droite de régression et les analyses de concordance entre les valeurs de CV.

- **La corrélation ou la régression linéaire** consiste à tester l'hypothèse de l'existence d'une relation de proportionnalité entre deux variables quantitatives, autrement dit étudier l'intensité de la liaison qui peut exister entre ces variables. Divers types de renseignements sont fournis par la régression linéaire notamment le **coefficient de corrélation linéaire** de Pearson, noté **r** qui donne La mesure de la corrélation linéaire entre les deux variables **et** son carré (r^2) représentant le pourcentage de variabilité expliquée par le modèle linéaire. **ce coefficient de corrélation est compris entre -1 et 1 et plus la valeur du r est proche de 1 plus les 2 techniques sont corrélées.**
- **La concordance de Bland et Altman** consiste à apprécier l'écart observé (biais) entre les valeurs obtenues par une technique de référence par rapport à une technique à tester et les limites de concordance qui représentent les écarts des valeurs d'une technique par rapport à l'autre. La concordance permet d'apprécier l'écart observé entre les 2 valeurs obtenues pour la mesure et d'en déduire, sur l'ensemble de la population observée, le biais, la précision, et les limites de l'intervalle de confiance à 95% afin de statuer sur la concordance des 2 séries de valeurs.

En effet le désaccord entre les 2 méthodes se calcule par le biais, estimé par la moyenne d et l'écart-type Sd des écarts et les limites de concordance à 95% sont évaluées par $d \pm 1,96 Sd$.

L'analyse de l'efficacité virologique dans notre étude est basée sur le seuil de l'échec virologique selon les recommandations de l'OMS 2013. Ainsi, tout patient ayant une charge virale détectable supérieure ou égale à 1000 copies/ml après 06 mois sous TARV est considéré comme étant en échec virologique.

3. RESULTATS

3.1. Echantillon étudié

Un nombre total de 666 échantillons a été étudié. Parmi ces échantillons, les 116 premiers ont fait l'objet d'analyse comparative des deux méthodes de confection des DBS et par la suite toute la population d'étude a fait l'objet d'analyse de l'efficacité virologique.

3.2. Caractéristiques de la population d'étude

3.2.1. La répartition du nombre d'inclusions en fonction des axes

Le tableau ci-dessous présente le nombre d'enfants prélevés par structure et par région.

Tableau VII : Répartition du nombre d'enfant en fonction des prélèvements

AXE	REGION	STRUCTURES	NOMBRE ENFANTS
NORD	3	18	168
CENTRE	5	32	293
SUD	5	22	205
TOTAL	13	72	666

Au total, 72 centres de PEC des enfants infectés par le VIH et répartis en 3 axes (Nord, Centre et Sud), constituent les sites pour l'échantillonnage. Globalement, 666 enfants ont été prélevés dont 51% de garçon (sexe ratio de 1,03).

3.2.2. La répartition des patients inclus selon l'âge

Les données étaient disponibles pour 462 enfants âgés de 6 mois à 19 ans, avec une médiane de 8 ans. La répartition de la population d'étude selon les tranches d'âges est présentée dans la figure 22.

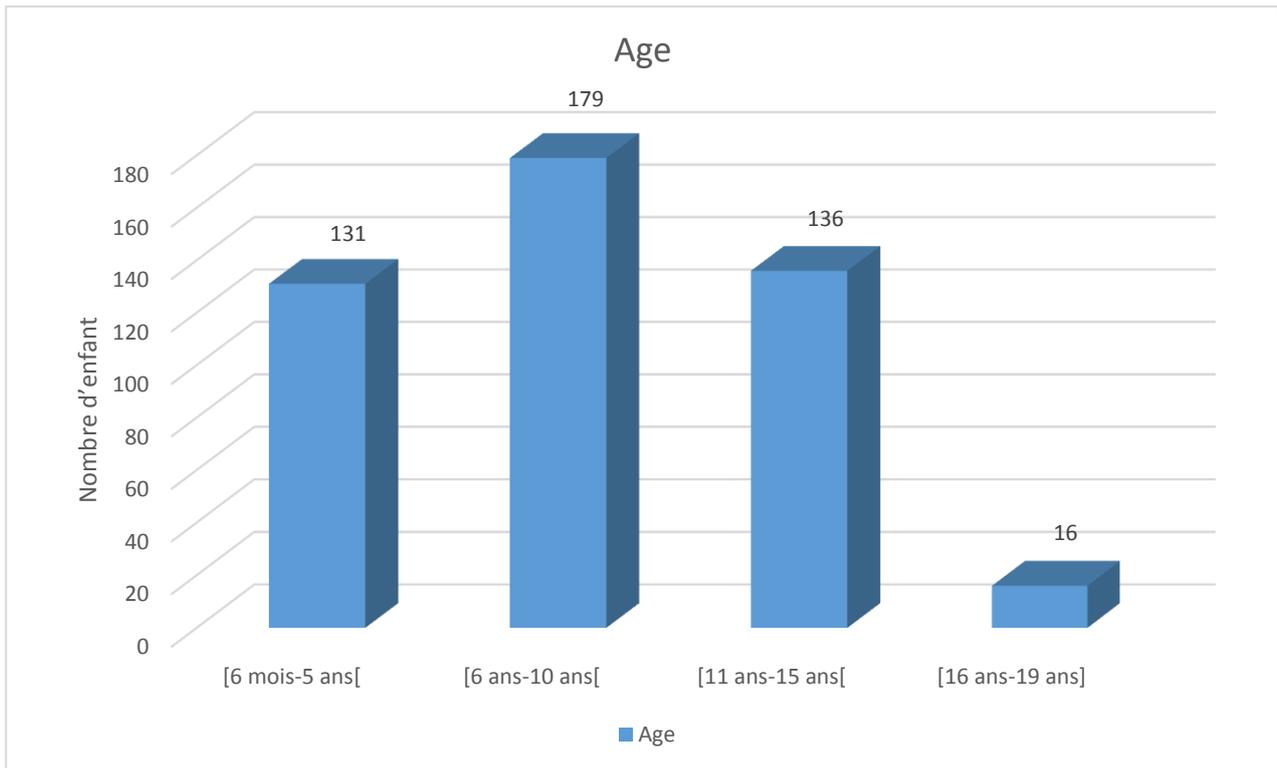


Figure 22 : Répartition des enfants selon les tranches d'âge

La population a été répartie en 4 tranches d'âge avec un intervalle de 5 ans pour chaque tranche (figure 23). La tranche d'âge la plus représentée était celle de 6-10 ans avec 179 enfants soit 38,7%. Les tranches de 6 mois-5ans, 11-15 ans et 16-19 ans étaient représentées successivement par 28,4% (131 enfants), 29,4% (136 enfants) et 3,5% (16 enfants).

3.2.3. La répartition des patients inclus selon le traitement ARV

Un total de 601 soit 90% des enfants étaient sous TARV, parmi lesquels, 495 (82,36%) recevaient comme schéma AZT+3TC+NVP/EFV. Le traitement incluant un IP était observé chez 41 enfants (6,82%) et les autres combinaisons incluant un Nuc + Non Nuc était observé 65 enfants (10,8) (figure 23).

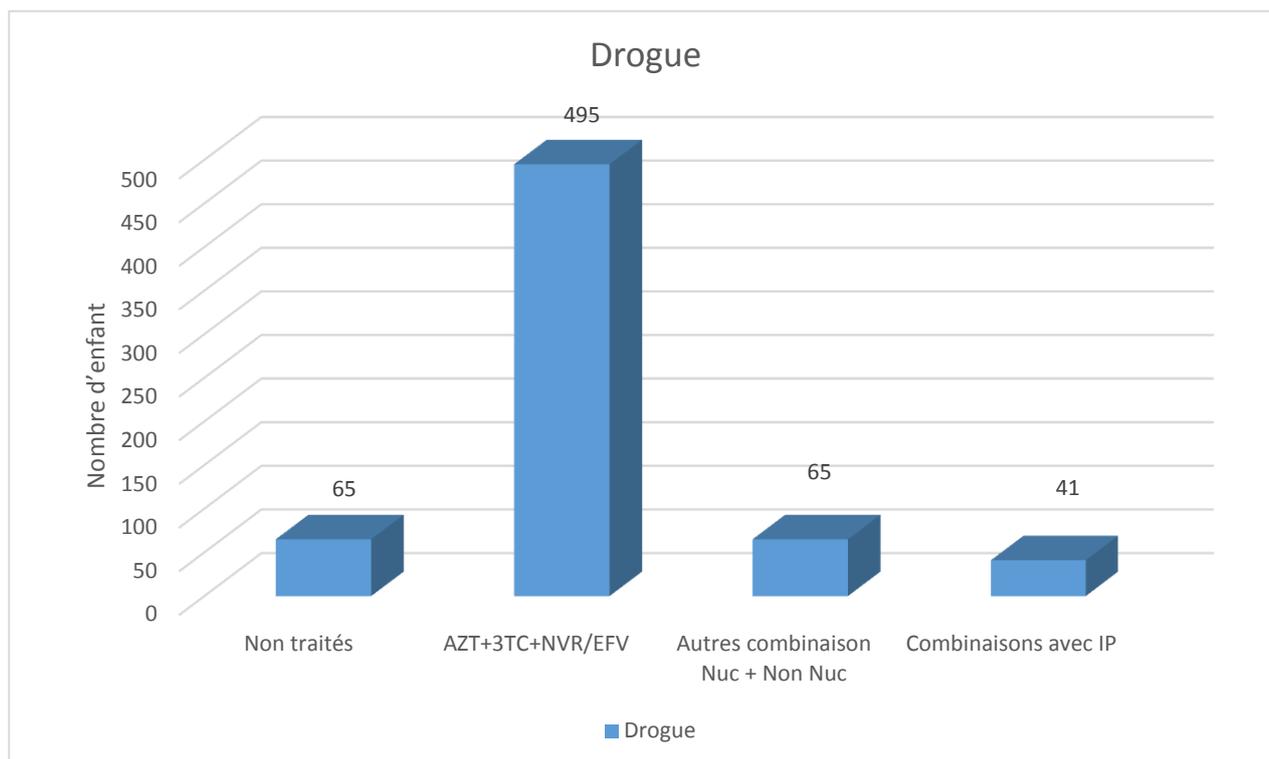


Figure 23 : Répartition des enfants selon le traitement

3.3. Etude comparative

Les résultats de CV obtenus à partir des DBS μ P et ceux obtenus à partir DBSPP ont été stratifiés en 3 catégories en fonction des résultats obtenus.

3.3.1. Les résultats de la CV obtenue à partir des DBS μ P

Les résultats sont présentés dans le tableau VIII ci-dessous.

Tableau VIII : Valeurs de CV DBS μ P

Classification des CV	Intervalles de valeurs (en copies/ml)	Intervalles de valeurs (en log)	N	Pourcentage (%)
indétectable	0 – 800	0 – 2,9 log	52	48,8
Moyenne	801 – 5000	2,9 – 3,7log	30	25,9
Elevée	> 5000	> 3,7 log	34	29,3
	Total		116	100

Sur les 116 DBS μ P, 52 avaient présentés une CV indétectable c'est-à-dire inférieure à 800 copies/ml selon le seuil de détection du NucliSENS EasyQ, et 64 avaient des valeurs de charge virale détectables variant entre 1000 et 570000 copies/ml c'est-à-dire entre 3 log et 5,76 log.

3.3.2. Les résultats de la CV obtenue à partir des DBSPP

Le tableau ci-dessous présente les résultats de CV obtenus à partir de DBSPP.

Tableau IX : Valeurs de CV DBSPP

Classification des CV	Intervalles de valeurs (en copies/ml)	Intervalles de valeurs (en log)	N	Pourcentage (%)
indétectable	0 – 800	0 – 2,9 log	50	43,1
Moyenne	801 – 5000	2,9 – 3,7log	32	27,6
Elevée	> 5000	> 3,7 log	34	29,3
Total			116	100

Sur les 116 DBSPP, 50 avaient une CV indétectables, et 66 avaient des valeurs de charge virale détectables variant entre 910 et 660000 copies/ml c'est à dire entre 2,90 log et 5,82 log.

3.3.3. La comparaison des valeurs de CV des deux méthodes

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

La comparaison qualitative permet de vérifier la concordance entre les deux types de prélèvement en termes de détectabilité ou non. La comparaison qualitative confirme la sensibilité de la technique (voir tableau X).

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

DBSPP \ DBS μ P	D	ND
D	62	4
ND	2	48

D : Détectable

ND : Non Détectable

- 62 échantillons ont été à la fois détectables pour les DBS μ P et pour les DBSPP
- 48 échantillons ont été à la fois non détectables pour les DBS μ P et pour les DBSPP
- 2 échantillons ont été détectables pour les DBS μ P et non détectables pour les DBSPP
- 4 échantillons ont été non détectables pour les DBS μ P et détectables pour les DBSPP

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

En effet 4 échantillons avaient présenté une discordance avec une différence de log \geq +/-0,5 (comprise entre +/-0,88 et +/-1,62). Ces discordances étaient observées pour des valeurs de CV indétectables pour les DBS μ P mais détectables pour les DBSPP sauf pour un échantillon dont les CV sont détectables pour les deux prélèvements.

Pour faciliter les analyses nous avons classé les CV en trois catégories (tableau XI).

Tableau XI : Différences de log des valeurs de CV des deux prélèvements de DBS

$\Delta \log \text{DBS}_{\mu\text{P}} - \text{DBSPP}$	N	Pourcentage
$\Delta \log \leq \pm 0,3$	93	80,17
$\pm 0,3 \leq \Delta \log \leq \pm 0,5$	19	16,38
$\pm 0,5 \leq \Delta \log \leq \pm 1$	2	1,72
$> \pm 1$	2	1,72

Sur les 116 patients de notre étude, la différence de log des CV des 112 patients était $< 0,5$ log et celle de 4 patients étaient $\geq 0,5$ log.

3.3.4. La droite de régression linéaire et la concordance entre les deux techniques (DBS μ P et DBSPP)

Les figures 24A et 24B présentent respectivement la droite de régression linéaire et l'analyse de concordance de Bland-Altman pour les résultats de CV DBS μ P vs DBSPP.

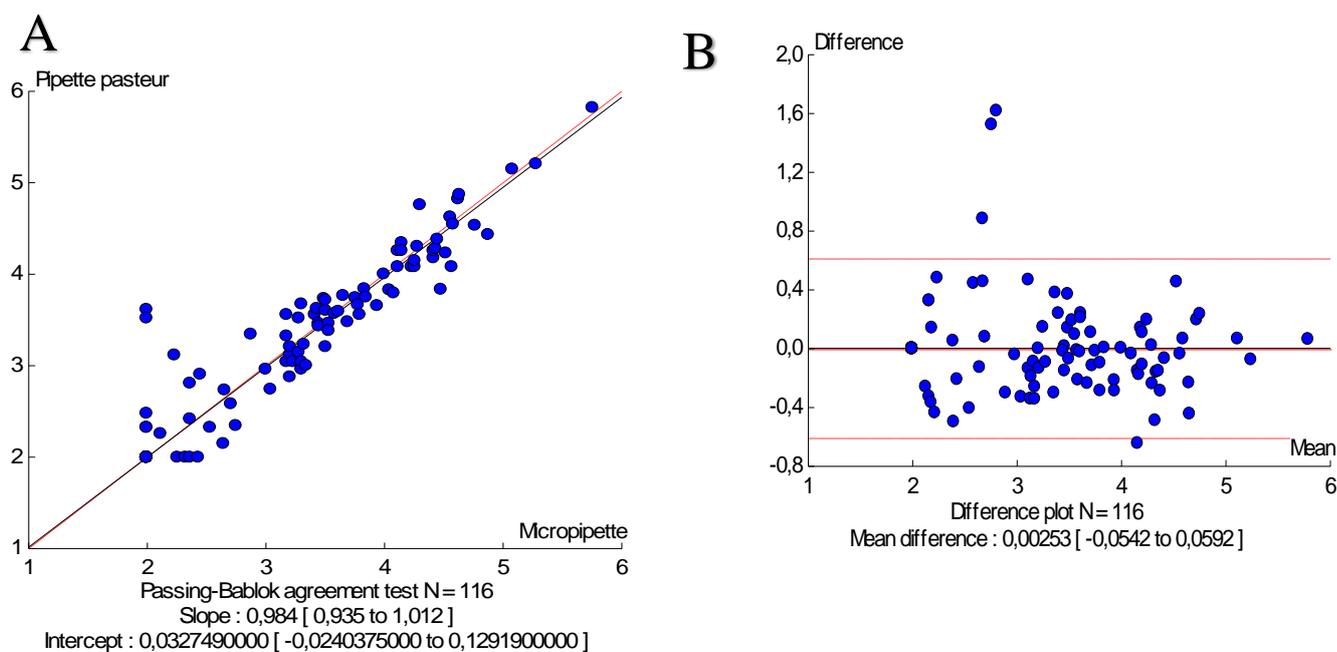


Figure 24 : Droite de Régression (A) et Bland-Altman (B) DBS μ P vs DBSPP

L'analyse de la droite de régression linéaire entre les valeurs de CV de DBS μ P et DBSPP a donné une bonne corrélation avec un coefficient **R= 0,95** et une **pente à 0,98** (figure 24).

Le graphe de Bland-Altman a donné un biais positif mais très faible de **0,00253** [-**0,0542** à + **0,0592**] avec 4 échantillons sur les 116 soit 3,4% qui sortent de l'intervalle de confiance (95%).

Au total, 112 échantillons présentaient des valeurs de CV concordantes entre les deux types de prélèvement contre seulement 4 qui présentaient une discordance. Le détail est consigné dans le tableau XII ci-dessous, les échantillons avec CV discordantes.

Tableau XII : Valeurs de CV et les différences de log des échantillons ayant montré une discordance

Numéros des échantillons	Pipette pasteur (PT)	log (PT)	Micropipette (μ P)	log (μ P)	log (μ P) - log(PT)
15645	4100	3,61	99	2,00	-1,62
15661	3300	3,52	99	2,00	-1,52
15637	1300	3,11	170	2,23	-0,88
15045	6800	3,83	30000	4,48	0,64

La différence de log des 4 échantillons discordants variaient entre -1,62 et +0,64. Pour trois parmi les quatre, les valeurs de CV des DBSPP étant supérieures à celles DBS μ P.

3.4. Evaluation virologique

3.4.1. Les résultats de la CV

Le tableau ci-dessous présente les différents résultats de CV pour toute la population d'étude.

Tableau XIII : Distribution des valeurs de CV

Classification des CV	Intervalles de valeurs (en copies/ml)	Intervalles de valeurs (en log)	N (%)
indélectable	0 – 800	0 – 2,9 log	232(34,8%)
Moyenne	801 – 1000	2.9 – 3 log	19 (2,9%)
Elevée	> 1000	> 3 log	415(62,3%)
Total			666

En effet, sur les 666 échantillons, 232 (34,8%) présentaient une charge virale indélectable (<800 copies/ml) et 434 (63,2%), une charge virale détectable (tableau XII).

3.4.2. Les résultats de la CV en fonction de la durée de suivi du TARV

Parmi les 666 enfants de notre étude, 601 étaient sous TARV dont 498 qui ont été suivis pour au moins pendant 6 mois. Les résultats de charges virales de ces enfants qui étaient sous TARV en fonction de la durée du traitement sont présentés dans le tableau XIV ci-dessous.

Tableau XIV : Charge virale en fonction de la durée de suivi chez les enfants sous TARV depuis au moins 6 mois

Durée du Traitement (mois)	6 - 12	13 - 24	> 24	TOTAL
CV indélectables	22(20%)	31(27,4%)	76(27,6%)	129 (26%)
CV détectables et < 3 log ₁₀	13(11,8%)	15(13,3%)	21(7,6%)	49(9,8%)
CV ≥ 3 log ₁₀ (Echec virologique)	75(68%)	67(59%)	178(65%)	320 (64%)
Nombre d'enfants	110	113	275	498

La proportion d'enfants en échec virologique était estimée à 64%. La médiane d'âge était de 9 ans. La proportion de garçons en échec était de 55,94% par rapport à celle des filles qui était de 43,13% et le sexe n'était pas précisé pour 3 enfants. Les enfants ayant reçu un TARV depuis plus de 24 mois étaient majoritaires avec comme schéma AZT+3TC+NVR/EFV.

3.4.3. L'échec virologique en fonction du schéma thérapeutique

Le nombre d'enfant en échec parmi les 498 sous TARV en fonction du schéma thérapeutique et la durée du traitement est présenté dans le tableau XV.

Tableau XV : Nombre d'enfants en échec en fonction du schéma thérapeutique et la durée de suivi

Durée du traitement (mois)	6-12	13-24	>24	TOTAL
AZT+3TC+NVP/EFV	66/98 (67,35%)	60/99 (60,61%)	148/228 (64,91%)	275/425 (64,70%)
Autres combinaison Nuc + Non Nuc	6/8(75)%	9/11(81,81%)	12/18(66,67%)	27/37(72,97%)
Combinaisons avec IP	3/4(75%)	0/35(0%)	16/29(55,17%)	19/36(52,78%)
Nombre d'enfant	75/110 (68,18%)	69/113 (61,06%)	176/275 (64%)	320/498 (64,25%)

Le taux d'échec virologique le plus élevé a été obtenu chez les enfants suivis pendant plus de 24 mois ($176/320 = 55\%$) avec le schéma suivant AZT+3TC+NVP/EFV comme prévalent ($228/498 = 45,78\%$).

COMMENTAIRES ET DISCUSSION

Notre travail a porté sur 666 enfants vivants avec le VIH en milieu décentralisé au Sénégal. Le but de cette étude était de démontrer que la pipette pasteur à bout fin (référence 222c), est une bonne alternative à la micropipette et d'évaluer l'efficacité virologique des enfants infectés par le VIH en milieu décentralisé à partir de DBS confection à l'aide de cette pipette pasteur.

Dans notre étude, la détermination de la CV nous a permis de faire la comparaison entre les deux pipettes et d'évaluer le taux d'échec virologique de ces enfants. La détermination de la CV du VIH utilise comme spécimen le plasma, du matériel onéreux et des équipements sophistiqués de laboratoire. Son utilisation reste donc limitée dans les sites de référence à cause des contraintes (maintien de la chaîne du froid, risque d'hémolyse...) liées à son acheminement à partir laboratoires périphérique vers les laboratoires de référence. Face à ces difficultés, le prélèvement sur papier buvard (DBS) a été utilisé comme support alternatif dans le monitoring biologique des PvVIH en milieu décentralisé.

Le DBS a été utilisé dans plusieurs études comme dans le diagnostic moléculaire des patients infectés par le VIH où il constitue un support convenable (120). Le DBS a également été recommandé par l'OMS pour le diagnostic précoce des enfants nés des mères séropositives à travers le monde mais surtout en Afrique. Il apporte aussi son avantage dans la détermination de la CV (13, 121), dans la détection de l'antigène p24 et la numération des lymphocytes T CD4 (122) mais aussi dans les tests de génotypage (123). Dans la plupart des études qui ont permis d'évaluer la CV sur DBS, un volume de 50µl obtenu avec une micropipette calibrée a été retenu comme suffisant et idéal pour la quantification des acides nucléiques viraux (13). En 2013 un travail a été mené aux USA par **Rottinghaus et coll**, où les prélèvements étaient réalisés avec 100µl de sang total (113). Dans l'étude de **Johannessen et coll** le volume de dépôt était de 75 et 80µl de sang total (124). Les cercles de DBS peuvent

aussi être remplis en déposant 3 gouttes de sang à l'aide de la pipette pasteur à bout fin, sensiblement égale au 50µl déposé avec la micropipette.

Après confection, les DBS ont été séchés à température ambiante pendant au moins 24h avant emballage comme dans la plupart des travaux publiés (125, 126). Au terme des 24h, les DBS ont été acheminés au LBV pour leur conserver à - 80°C jusqu'à utilisation. Cependant la température et le temps de conservation ne sont pas toujours les mêmes dans les différents travaux. **Kane et coll**, dans leur étude de quantification de l'ARN du VIH-1 sur DBS par la technique ne NucliSENS EasyQ, ont conservé leur DBS à 37°C pendant 8 et 15 jours (13). En 2012 **Arredondo et coll**, dans leur étude de comparaison de CV entre plasma et DBS, ont conservé et stocké leur DBS et plasma à -20°C jusqu'à utilisation (127). Dans le travail de comparaison de différents papiers filtres par **Rottinghaus et coll** aux USA pour la résistance aux ARV, ils ont conservé et stocké leur DBS à -80°C jusqu'à leur utilisation (128). Au laboratoire, nous avons utilisé cette même température de conservation pour nos DBS jusqu'à leurs utilisations car étant la température de conservation et de stockage optimal des DBS (129). Plus la température est basse et plus l'ARN du VIH se conserve mieux.

Les CV ont été effectués avec la technologie NucliSENS version 2.0 car celle-ci ayant montré une bonne performance dans le travail de comparaison des performances du NucliSENS EasyQ HIV-1 V2.0 à celles du NucliSENS EasyQ HIV-1 V1.2 à partir de DBS et plasma, de **Kane et coll** au Sénégal (130). L'extraction des acides nucléiques a été effectué avec l'extracteur automate NucliSENS EasyMAG et l'extracteur semi-automate NucliSENS MiniMAG à partir de 2 spots coupés à l'aide d'un puncher calibré de 12 mm de diamètre. La quantification des acides nucléiques a été effectuée par la technique d'amplification NASBA en temps réel avec le NucliSENS EasyQ v2.0. D'autre travaux comme celui de **Kane et coll**, celui de **Van Deursen et coll** et celui de **Rottinghaus et coll** (13, 113, 131) ont montré une bonne concordance dans leurs études comparatives de CV entre plasma et DBS, confirmant

la fiabilité, la sensibilité et la spécificité de la plateforme NucliSENS qui a servi à la détermination des CV de notre évaluation.

Notre étude évaluant la pipette pasteur comme outil alternatif à la micropipette et portant sur un nombre 116 échantillons de DBS, a donné des résultats satisfaisants. Selon que les DBS ont été réalisés avec la micropipette (DBS μ P) ou avec la pipette pasteur (DBSPP), les CV obtenues variaient respectivement entre <100 et 570000 copies/ml et entre <100 et 660000 copies/ml. La comparaison qualitative des résultats des deux techniques a montré un taux de non détectabilité de 41,4% et de défectibilité de 53,5% pour DBS μ P et DBSPP. Le taux de non détectabilité pour DBS μ P et de détectabilité pour DBSPP étaient de 3,4% et le taux de non détectabilité pour DBSPP et de détectabilité pour DBS μ P étaient de 1,7%. Ces résultats ont montré une bonne concordance des deux outils de prélèvement. Quant à la comparaison quantitative, les taux de non détectabilité étaient de 44,8% pour les DBS μ P et de 43,1% pour les DBSPP et les taux de détectabilité étaient de 55,2% pour DBS μ P et de 56,9% pour DBSPP. Les résultats de cette comparaison ont confirmé la précédente. Pour des valeurs de CV détectable ou indétectable, ces chiffres ont montré qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux outils de prélèvement. La différence de log des valeurs de CV obtenue entre les deux échantillons de DBS a donné une CV < +/-0,5 log pour 112 échantillons et une CV \geq +/-0,5 que pour 4 échantillons. Donc sur les 116 échantillons, les valeurs sont concordantes pour 112 (96,6%) et ne sont discordantes que pour 4 (3,4%) comme ça été démontré par le graphique de Bland-Altman avec un biais de 0,00253 [- 0,0542 à + 0,0592]. Ces résultats ont été confirmés par la droite de régression linéaire entre les valeurs de CV (DBS μ P vs DBSPP) montrant une bonne corrélation (R= 0,95). Le travail de **Ndiaye et coll**, mené au Sénégal en 2015 a montré des valeurs de R similaire au notre (**109**). Il en est de même avec l'étude de **Scott et coll**, mené en 2009 et ayant montré une valeur de R = 0,904 (**132**). Sur la validité de ces paramètres statistiques, nos résultats ont montré que la pipette pasteur est une bonne alternative à la micropipette pour la confection des DBS grâce à un taux de concordance élevé et une bonne corrélation.

Par conséquent, le suivi de l'efficacité virologique, des enfants infectés par le VIH en milieu décentralisé, a été facilité par l'utilisation de cet outil pour la confection des DBS destinés à la charge virale dans le projet EnPRISE.

L'analyse de l'efficacité virologique a porté sur les 666 enfants inclus dans le projet EnPRISE dont 498 étaient suivis pour au moins pendant 6 mois de traitement antirétroviral. Cette population était supérieure à la population d'étude de **Kébé et coll** en 2013 à Dakar et celle de **Salou et coll** au Togo en 2016 portant respectivement sur 125 et 283 enfants (**115, 133**) mais inférieure à celle de **Zanoni et coll** en 2012 avec 880 enfants (**134**). Dans notre étude, la population était composée en majorité de garçons (53%), distribution différente de celle observée dans l'étude de **Lubega et coll (120)** avec 53% de filles. L'âge n'a pas été renseigné pour certains enfants et pour ceux dont l'âge est connu, la médiane d'âge était de 8 ans, valeur supérieure à celle retrouvée dans la série de **Kébé et coll** en 2013 et dans la série de **Isaakidis et coll** en 2009 (**135**) qui étaient respectivement de 7 et de 6 ans mais proche de celle retrouvée (8,9 ans) dans la série de **Zoufaly et coll (136)**. La durée médiane de suivi thérapeutique sous ARV dans notre population d'étude était de 28 mois [6-191]. Cette durée était supérieure à celle retrouvée dans la série de **Kébé et coll** qui était de 20 mois [6-120] et inférieure aux études de **Salou et coll** et **d'Isaakidis et coll** qui étaient respectivement de 48 mois et 36,2 mois.

Un taux d'échec global de 64% (320/498) a été obtenu dans notre étude, sensiblement égale au taux d'échec virologique (66%) documenté par **kébé et coll**, en 2013 (**115**) et inférieur au taux d'échec (51,6%) renseigné par **Salou et coll** au Togo en 2016 (**133**). Ce taux d'échec important de notre étude pourrait être expliqué par l'influence des facteurs comme les niveaux sociaux et psychologiques associés à une absence de suivi virologique. En exploitant ces taux d'échec en fonction des mois de suivi, nous avons constaté que les enfants qui ont été suivis pour plus de 24 mois présentaient le taux d'échec virologique le plus élevé (65%). Ces enfants étaient majoritairement sous un schéma thérapeutique de 1^{ère} ligne incluant AZT+3TC+NVP/EFV (45,78%). Les études antérieures ont toujours postulé l'idée que le risque d'échec virologique

augmentait sous un schéma thérapeutique non efficace dans le long terme. Ceci a été confirmé par des études de cohorte mettant l'accent sur la non efficacité d'un schéma thérapeutique de première ligne (137). Ces résultats justifient, encore une fois, l'importance d'un monitoring virologique régulier par la quantification de la charge virale afin d'éviter une longue exposition des patients sous un schéma thérapeutique non efficace. Ceci est d'autant plus important au niveau des pays à ressources limitées comme le Sénégal où, les schémas de 2nde ligne sont assez coûteux et ceux de la 3^{ème} ligne pas toujours disponible.

**CONCLUSION ET
RECOMMANDATIONS**

Le VIH responsable du SIDA, constitue un véritable problème de santé publique touchant adultes, adolescents et enfants avec des prévalences considérablement élevées en Afrique subsaharienne mais la tendance au Sénégal reste très faible de l'ordre de 0,5%. L'engagement de la PEC des PvVIH avec notamment le programme ISAARV au Sénégal a amélioré la qualité de vie de ces personnes. Le monitoring virologique a aussi été amélioré par l'utilisation des DBS confectionnés par micropipette, comme support de prélèvement moins contraignant que le prélèvement sur tube car son transport exige le maintien de la chaîne de froid entre le lieu de collecte et le laboratoire d'analyse. L'utilisation du DBS a facilité le suivi des patients au niveau décentralisé. Cependant, le manque de suivi métrologique des équipements de laboratoire particulièrement les micropipettes a montré des limites liées à la spécificité en volume et à la calibration. Cette contrainte métrologique associée à un manque de micropipettes surtout en zone reculée nous ont permis d'évaluer la pipette pasteur à bout fin comme outil alternatif à la micropipette pour la confection de DBS. Cette évaluation a donné une bonne corrélation ($R= 0,95$) et une parfaite concordance (96%) avec un biais de 0,00253. Ainsi la pipette pasteur constitue une bonne alternative à la micropipette pour la confection des DBS destinés à la CV.

Dans la même étude, l'échec ou le succès virologique des enfants sous ARV a été évalué grâce à l'utilisation de 666 échantillons de DBS confectionnés par la pipette pasteur. Nos résultats ont montré un taux d'échec virologique élevé de 64%. Ce taux d'échec corrélé à la durée du suivi a montré que les enfants sous ARV pendant plus de 24 mois, étaient plus en échec (65%) avec un schéma thérapeutique de 1^{ère} ligne incluant AZT+3TC+NVP/EFV (45,78%).

Globalement, nos résultats montrent encore une fois la nécessité de la mise à disposition d'outils de prélèvements pouvant faciliter les tests de CV et ainsi améliorer le monitoring virologique des PvVIH en milieu décentralisé. Grâce à un suivi virologique régulier des PvVIH, nous pouvons diagnostiquer à temps les risques d'échec virologiques qui pourront aboutir aux échecs thérapeutiques.

En perspective, nous comptons évaluer d'autres systèmes de prélèvements comme celui de sang capillaire sur papier buvard pour la quantification de la CV.

Ce travail nous a permis de formuler quelques recommandations à l'endroit de personnel scientifique d'une part et des autorités politiques nationales et sanitaires, d'autre part.

❖ Le personnel scientifique devra assurer :

- la formation des techniciens de laboratoire sur l'utilisation des pipettes pasteurs pour la confection des DBS.

❖ Les autorités de santé, à leur tour :

- doit participer à la mise à disposition des pipettes pasteurs dans les laboratoires périphériques,
- d'inciter le staff clinique à inclure d'avantage les paramètres virologiques dans la prise en charge clinique et thérapeutique des personnes infectées par le VIH en milieu décentralisé.
- rendre disponible la charge virale

REFERENCES

1. **Peeters M CM.** Origine et diversité génétique du virus de l'immunodéficience humaine : d'où vient-il, où va-t-il ? *Virology journal*. 2013;17(3):119-131
2. **de Silva TI, Cotten M, Rowland-Jones SL.** HIV-2: the forgotten AIDS virus. *Trends in microbiology*. 2008;16(12):588-595
3. **Van Heuerswyn F, Li Y, Neel C, Bailes E, Keele BF, Liu W, Loul S, Butel C, Liegeois F, Bienvenue Y, Ngolle EM, Sharp PM, Shaw GM, Delaporte E, Hahn BH, Peeters M.** Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature*. 2006;444(7116):164
4. **Peeters M, Delaporte E.** [Genetic diversity of HIV infection worldwide and its consequences]. *Medecine tropicale : revue du Corps de sante colonial*. 1999;59(4 Pt 2):449-455
5. **Damond F, Worobey M, Campa P, Farfara I, Colin G, Matheron S, Brun-Vezinet F, Robertson DL, Simon F.** Identification of a highly divergent HIV type 2 and proposal for a change in HIV type 2 classification. *AIDS research and human retroviruses*. 2004;20(6):666-672
6. **Ayouba A, Akoua-Koffi C, Calvignac-Spencer S, Esteban A, Locatelli S, Li H, Li Y, Hahn BH, Delaporte E, Leendertz FH, Peeters M.** Evidence for continuing cross-species transmission of SIVsmm to humans: characterization of a new HIV-2 lineage in rural Cote d'Ivoire. *Aids*. 2013;27(15):2488-2491

7. **ONUSIDA.** **WORL AIDS DAY 2015.**
http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/20150901_FactSheet_2015_fr.pdf: 2015.
8. **ONUSIDA.** **Estimations du VIH/SIDA au sénégal.**
<http://www.unaids.org/fr/regionscountries/countries/senegal>. 2014
9. **OMS.** **Nouvelles recommandations.** communiqué de presse. 30 SEPTEMBRE 2015
10. **OMS/sida, Rapport, «3X5».** largissement de l'accès au traitement antirétroviral dans le monde. Le point sur l'initiative «3millions d'ici 2005». 2005
11. **O'Brien WA, Hartigan PM, Daar ES, Simberkoff MS, Hamilton JD.** Changes in plasma HIV RNA levels and CD4+ lymphocyte counts predict both response to antiretroviral therapy and therapeutic failure. VA Cooperative Study Group on AIDS. *Annals of internal medicine.* 1997;126(12):939-945
12. **Knuchel MC, Jullu B, Shah C, Tomasik Z, Stoeckle MP, Speck RF, Nadal D, Mshinda H, Boni J, Tanner M, Schupbach J.** Adaptation of the ultrasensitive HIV-1 p24 antigen assay to dried blood spot testing. *Journal of acquired immune deficiency syndromes.* 2007;44(3):247-253
13. **Kane CT, Ndiaye HD, Diallo S, Ndiaye I, Wade AS, Diaw PA, Gaye-Diallo A, Mboup S.** Quantitation of HIV-1 RNA in dried blood spots by the real-time NucliSENS EasyQ HIV-1 assay in Senegal. *Journal of virological methods.* 2008;148(1-2):291-295
14. **Simon F, Mauclore P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Muller-Trutwin MC, Saragosti S, Georges-Courbot MC, Barre-Sinoussi F, Brun-Vezinet F.** Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nature medicine.* 1998;4(9):1032-1037
15. **Fauci AS.** The AIDS epidemic--considerations for the 21st century. *The New England journal of medicine.* 1999;341(14):1046-1050
16. **ALTMAN LK.** CLUE FOUND ON HOMOSEXUALS' PRECANCER SYNDROME
<http://www.nytimes.com/1982/06/18/us/clue-found-on-homosexuals-precancer-syndrome.html> 18 juin 1982.
17. **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.** Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* (New York, NY). 1983;220(4599):868-871
18. **Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, Laurent AG, Dauguet C, Katlama C, Rouzioux C, et al.** Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* (New York, NY). 1986;233(4761):343-346
19. **Ndung'u T, Weiss RA.** On HIV diversity. *Aids*. 2012;26(10):1255-1260
20. **Peeters M, Chaix ML, Delaporte E.** [Genetic diversity and phylogeographic distribution of SIV: how to understand the origin of HIV]. *Medecine sciences : M/S*. 2008;24(6-7):621-628
21. **Neel C, Etienne L, Li Y, Takehisa J, Rudicell RS, Bass IN, Moudindo J, Mebenga A, Esteban A, Van Heuverswyn F, Liegeois F, Kranzusch PJ, Walsh PD, Sanz CM, Morgan DB, Ndjango JB, Plantier JC, Locatelli S, Gonder MK, Leendertz FH, Boesch C, Todd A, Delaporte E, Mpoudi-Ngole E, Hahn BH, Peeters M.** Molecular epidemiology of simian immunodeficiency virus infection in wild-living gorillas. *Journal of virology*. 2010;84(3):1464-1476
22. **Santiago ML, Range F, Keele BF, Li Y, Bailes E, Bibollet-Ruche F, Fruteau C, Noe R, Peeters M, Brookfield JF, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH.** Simian immunodeficiency virus infection in free-ranging sooty mangabeys (*Cercocebus atys atys*) from the Tai Forest, Cote d'Ivoire: implications for the origin of epidemic human immunodeficiency virus type 2. *Journal of virology*. 2005;79(19):12515-12527
23. **Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE.** The Interactions of Retroviruses and their Hosts. In: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997.
24. **Coffin J EM, Gallo R, Graf TM, Hinuma Y, Hunter E.** Retroviridae with ICTV report 2003. http://lifebio2edu/Ictv/fs_retrohtml.
25. **Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE.** *Retroviruses*. Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997.

26. **Turner BG, Summers MF.** Structural biology of HIV. *Journal of molecular biology.* 1999;285(1):1-32
27. **Dolcetti R, Giagulli C, He W, Selleri M, Caccuri F, Eyzaguirre LM, Mazzuca P, Corbellini S, Campilongo F, Marsico S, Giombini E, Muraro E, Rozera G, De Paoli P, Carbone A, Capobianchi MR, Ippolito G, Fiorentini S, Blattner WA, Lu W, Gallo RC, Caruso A.** Role of HIV-1 matrix protein p17 variants in lymphoma pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2015;112(46):14331-14336
28. **Briggs JA, Grunewald K, Glass B, Forster F, Krausslich HG, Fuller SD.** The mechanism of HIV-1 core assembly: insights from three-dimensional reconstructions of authentic virions. *Structure (London, England : 1993).* 2006;14(1):15-20
29. **Solbak SM, Reksten TR, Hahn F, Wray V, Henklein P, Halskau O, Schubert U, Fossen T.** HIV-1 p6 - a structured to flexible multifunctional membrane-interacting protein. *Biochimica et biophysica acta.* 2013;1828(2):816-823
30. **Pancera M.** Structure, fonction et antigénicité des glycoprotéines d'enveloppe du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH1). *Virologie.* 2005;9(6):458
31. **Gonda MA.** Molecular genetics and structure of the human immunodeficiency virus. *Journal of electron microscopy technique.* 1988;8(1):17-40
32. **Seelamgari A, Maddukuri A, Berro R, de la Fuente C, Kehn K, Deng L, Dadgar S, Bottazzi ME, Ghedin E, Pumfery A, Kashanchi F.** Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library.* 2004;9:2388-2413
33. **Fox JM, Hilburn S, Demontis MA, Brighty DW, Rios Grassi MF, Galvao-Castro B, Taylor GP, Martin F.** Long Terminal Repeat Circular DNA as Markers of Active Viral Replication of Human T Lymphotropic Virus-1 in Vivo. *Viruses.* 2016;8(3)
34. **Nielsen MH, Pedersen FS, Kjems J.** Molecular strategies to inhibit HIV-1 replication. *Retrovirology.* 2005;2:10

35. **Freed EO.** HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology*. 1998;251(1):1-15
36. **Darke PL, Nutt RF, Brady SF, Garsky VM, Ciccarone TM, Leu CT, Lumma PK, Freidinger RM, Veber DF, Sigal IS.** HIV-1 protease specificity of peptide cleavage is sufficient for processing of gag and pol polyproteins. *Biochemical and biophysical research communications*. 1988;156(1):297-303
37. **di Marzo Veronese F, Copeland TD, DeVico AL, Rahman R, Oroszlan S, Gallo RC, Sarngadharan MG.** Characterization of highly immunogenic p66/p51 as the reverse transcriptase of HTLV-III/LAV. *Science (New York, NY)*. 1986;231(4743):1289-1291
38. **Vink C aPR.** The human immunodeficiency virus integrase protein. . *Trends Genet* 1993;12(9):433-438
39. **Arrildt KT, Joseph SB, Swanstrom R.** The HIV-1 env protein: a coat of many colors. *Current HIV/AIDS reports*. 2012;9(1):52-63
40. **M P.** Structure, Fonction Et Antigénicité Des Glycoprotéines D'enveloppe Du Virus De L'immunodéficience Humaine De Type 1 *Virologie*. 2005;9:457-472.
41. **Verrier F, Borman AM, Brand D, Girard M.** Role of the HIV type 1 glycoprotein 120 V3 loop in determining coreceptor usage. *AIDS research and human retroviruses*. 1999;15(8):731-743
42. **Mische CC, Yuan W, Strack B, Craig S, Farzan M, Sodroski J.** An alternative conformation of the gp41 heptad repeat 1 region coiled coil exists in the human immunodeficiency virus (HIV-1) envelope glycoprotein precursor. *Virology*. 2005;338(1):133-143
43. **Brady J, Kashanchi F.** Tat gets the "green" light on transcription initiation. *Retrovirology*. 2005;2:69
44. **Ramratnam B, Mittler JE, Zhang L, Boden D, Hurley A, Fang F, Macken CA, Perelson AS, Markowitz M, Ho DD.** The decay of the latent reservoir of replication-competent HIV-1 is inversely correlated with the extent of residual

viral replication during prolonged anti-retroviral therapy. *Nature medicine*. 2000;6(1):82-85

45. **Kameoka M, Morgan M, Binette M, Russell RS, Rong L, Guo X, Mouland A, Kleiman L, Liang C, Wainberg MA.** The Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) can promote placement of tRNA primer onto viral RNA and suppress later DNA polymerization in HIV-1 reverse transcription. *Journal of virology*. 2002;76(8):3637-3645
46. **Karn J, Stoltzfus CM.** Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012;2(2):a006916
47. **Levin A, Hayouka Z, Helfer M, Brack-Werner R, Friedler A, Loyter A.** Peptides derived from HIV-1 integrase that bind Rev stimulate viral genome integration. *PloS one*. 2009;4(1):e4155
48. **Li L, Li HS, Pauza CD, Bukrinsky M, Zhao RY.** Roles of HIV-1 auxiliary proteins in viral pathogenesis and host-pathogen interactions. *Cell research*. 2005;15(11-12):923-934
49. **Strebel K, Daugherty D, Clouse K, Cohen D, Folks T, Martin MA.** The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature*. 1987;328(6132):728-730
50. **Zhang H, Yang B, Pomerantz RJ, Zhang C, Arunachalam SC, Gao L.** The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature*. 2003;424(6944):94-98
51. **Conticello SG, Harris RS, Neuberger MS.** The Vif protein of HIV triggers degradation of the human antiretroviral DNA deaminase APOBEC3G. *Current biology : CB*. 2003;13(22):2009-2013
52. **Guo F, Cen S, Niu M, Yang Y, Gorelick RJ, Kleiman L.** The interaction of APOBEC3G with human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid inhibits tRNA³Lys annealing to viral RNA. *Journal of virology*. 2007;81(20):11322-11331

53. **Chen R, Le Rouzic E, Kearney JA, Mansky LM, Benichou S.** Vpr-mediated incorporation of UNG2 into HIV-1 particles is required to modulate the virus mutation rate and for replication in macrophages. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(27):28419-28425
54. **Sharma A, Yilmaz A, Marsh K, Cochrane A, Boris-Lawrie K.** Thriving under stress: selective translation of HIV-1 structural protein mRNA during Vpr-mediated impairment of eIF4E translation activity. *PLoS pathogens*. 2012;8(3):e1002612
55. **Tristem M, Marshall C, Karpas A, Hill F.** Evolution of the primate lentiviruses: evidence from vpx and vpr. *The EMBO journal*. 1992;11(9):3405-3412
56. **Ruiz A, Guatelli JC, Stephens EB.** The Vpu protein: new concepts in virus release and CD4 down-modulation. *Current HIV research*. 2010;8(3):240-252
57. **Roeth JF, Collins KL.** Human immunodeficiency virus type 1 Nef: adapting to intracellular trafficking pathways. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2006;70(2):548-563
58. **Baur AS, Sawai ET, Dazin P, Fantl WJ, Cheng-Mayer C, Peterlin BM.** HIV-1 Nef leads to inhibition or activation of T cells depending on its intracellular localization. *Immunity*. 1994;1(5):373-384
59. **Matusali G, Potesta M, Santoni A, Cerboni C, Doria M.** The human immunodeficiency virus type 1 Nef and Vpu proteins downregulate the natural killer cell-activating ligand PVR. *Journal of virology*. 2012;86(8):4496-4504
60. **Perkins ND, Edwards NL, Duckett CS, Agranoff AB, Schmid RM, Nabel GJ.** A cooperative interaction between NF-kappa B and Sp1 is required for HIV-1 enhancer activation. *The EMBO journal*. 1993;12(9):3551-3558
61. **Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS.** New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *The New England journal of medicine*. 1993;328(5):327-335
62. **Gorry PR, Ancuta P.** Coreceptors and HIV-1 pathogenesis. *Current HIV/AIDS reports*. 2011;8(1):45-53

63. **Morrow G, Vachot L, Vagenas P, Robbiani M.** Current concepts of HIV transmission. *Current HIV/AIDS reports*. 2007;4(1):29-35
64. **Kim BC, Ju MK, Dan-Chin-Yu A, Sommer P.** Quantitative detection of HIV-1 particles using HIV-1 neutralizing antibody-conjugated beads. *Analytical chemistry*. 2009;81(6):2388-2393
65. **Church JD, Huang W, Mwatha A, Musoke P, Jackson JB, Bagenda D, Omer SB, Donnell D, Nakabiito C, Eure C, Guay LA, Taylor A, Bakaki PM, Matovu F, McConnell M, Fowler MG, Eshleman SH.** Analysis of HIV tropism in Ugandan infants. *Current HIV research*. 2010;8(7):498-503
66. **Nisole S, Saib A.** Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology*. 2004;1:9
67. **Pancera M, Wyatt R.** Selective recognition of oligomeric HIV-1 primary isolate envelope glycoproteins by potently neutralizing ligands requires efficient precursor cleavage. *Virology*. 2005;332(1):145-156
68. **Moore JP, Doms RW.** The entry of entry inhibitors: a fusion of science and medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(19):10598-10602
69. **Basu VP, Song M, Gao L, Rigby ST, Hanson MN, Bambara RA.** Strand transfer events during HIV-1 reverse transcription. *Virus research*. 2008;134(1-2):19-38
70. **Lewinski MK, Yamashita M, Emerman M, Ciuffi A, Marshall H, Crawford G, Collins F, Shinn P, Leipzig J, Hannenhalli S, Berry CC, Ecker JR, Bushman FD.** Retroviral DNA integration: viral and cellular determinants of target-site selection. *PLoS pathogens*. 2006;2(6):e60
71. **Gu H, Das Gupta J, Schoenberg DR.** The poly(A)-limiting element is a conserved cis-acting sequence that regulates poly(A) tail length on nuclear pre-mRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(16):8943-8948

72. **Carvajal F, Vallejos M, Walters BA, Contreras N, Hertz MI, Olivares E, Caceres CJ, Pino K, Letelier A, Thompson SR, Lopez-Lastra M.** Structural domains within the HIV-1 mRNA and the ribosomal protein S25 influence cap-independent translation initiation. *The FEBS journal*. 2016
73. **Woodward CL, Cheng SN, Jensen GJ.** Electron cryotomography studies of maturing HIV-1 particles reveal the assembly pathway of the viral core. *Journal of virology*. 2015;89(2):1267-1277
74. **Rambaut A, Posada D, Crandall KA, Holmes EC.** The causes and consequences of HIV evolution. *Nature reviews Genetics*. 2004;5(1):52-61
75. **Smyth RP, Davenport MP, Mak J.** The origin of genetic diversity in HIV-1. *Virus research*. 2012;169(2):415-429
76. **Bakhanashvili M, Novitsky E, Levy I, Rahav G.** The fidelity of DNA synthesis by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase increases in the presence of polyamines. *FEBS letters*. 2005;579(6):1435-1440
77. **Simon-Loriere E, Galetto R, Hamoudi M, Archer J, Lefeuvre P, Martin DP, Robertson DL, Negroni M.** Molecular mechanisms of recombination restriction in the envelope gene of the human immunodeficiency virus. *PLoS pathogens*. 2009;5(5):e1000418
78. **Yang OO, Daar ES, Jamieson BD, Balamurugan A, Smith DM, Pitt JA, Petropoulos CJ, Richman DD, Little SJ, Brown AJ.** Human immunodeficiency virus type 1 clade B superinfection: evidence for differential immune containment of distinct clade B strains. *Journal of virology*. 2005;79(2):860-868
79. **Ward MJ, Lycett SJ, Kalish ML, Rambaut A, Leigh Brown AJ.** Estimating the rate of intersubtype recombination in early HIV-1 group M strains. *Journal of virology*. 2013;87(4):1967-1973
80. **Barbour JD, Grant RM.** The role of viral fitness in HIV pathogenesis. *Current HIV/AIDS reports*. 2005;2(1):29-34
81. **Kuiken CL, Zwart G, Baan E, Coutinho RA, van den Hoek JA, Goudsmit J.** Increasing antigenic and genetic diversity of the V3 variable domain of the human immunodeficiency virus envelope protein in the course of the AIDS

epidemic. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1993;90(19):9061-9065

82. **Bélec SMG-MG-DCTKL.** Biologie appliquée de l' infection à VIH et de ses comorbidités en Afrique 2015.
83. **Brennan CA, Bodelle P, Coffey R, Devare SG, Golden A, Hackett J, Jr., Harris B, Holzmayer V, Luk KC, Schochetman G, Swanson P, Yamaguchi J, Vallari A, Ndembi N, Ngansop C, Makamche F, Mbanya D, Gurtler LG, Zekeng L, Kaptue L.** The prevalence of diverse HIV-1 strains was stable in Cameroonian blood donors from 1996 to 2004. Journal of acquired immune deficiency syndromes. 2008;49(4):432-439
84. **Liegeois F, Boue V, Butel C, Mouinga-Ondeme A, Sica J, Zamba C, Peeters M, Delaporte E, Rouet F.** HIV type-1 group O infection in Gabon: low prevalence rate but circulation of genetically diverse and drug-resistant HIV type-1 group O strains. AIDS research and human retroviruses. 2013;29(7):1085-1090
85. **Keele BF, Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Takehisa J, Santiago ML, Bibollet-Ruche F, Chen Y, Wain LV, Liegeois F, Loul S, Ngole EM, Bienvenue Y, Delaporte E, Brookfield JF, Sharp PM, Shaw GM, Peeters M, Hahn BH.** Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. Science (New York, NY). 2006;313(5786):523-526
86. **Delaugerre C, De Oliveira F, Lascoux-Combe C, Plantier JC, Simon F.** HIV-1 group N: travelling beyond Cameroon. Lancet. 2011;378(9806):1894
87. **Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemee V, Damond F, Robertson DL, Simon F.** A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. Nature medicine. 2009;15(8):871-872
88. **Vallari A, Holzmayer V, Harris B, Yamaguchi J, Ngansop C, Makamche F, Mbanya D, Kaptue L, Ndembi N, Gurtler L, Devare S, Brennan CA.** Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. Journal of virology. 2011;85(3):1403-1407
89. **Peeters M, Jung M, Ayouba A.** The origin and molecular epidemiology of HIV. Expert review of anti-infective therapy. 2013;11(9):885-896

90. **Parris GE.** How did the ancestral HIV-1 group M retrovirus get to Leopoldville from southeastern Cameroon? *Medical hypotheses.* 2007;69(5):1098-1101
91. **Cohen MS.** HIV and sexually transmitted diseases: lethal synergy. *Topics in HIV medicine : a publication of the International AIDS Society, USA.* 2004;12(4):104-107
92. **Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, Orenstein JM, Kotler DP, Fauci AS.** HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature.* 1993;362(6418):355-358
93. **Livingstone WJ, Moore M, Innes D, Bell JE, Simmonds P.** Frequent infection of peripheral blood CD8-positive T-lymphocytes with HIV-1. *Edinburgh Heterosexual Transmission Study Group. Lancet.* 1996;348(9028):649-654
94. **Ballouhey Q, Villemagne T, Cros J, Vacquerie V, Berenguer D, Braik K, Szwarc C, Longis B, Lardy H, Fourcade L.** Assessment of paediatric thoracic robotic surgery. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery.* 2015;20(3):300-303
95. **Bucher JB, Thomas KM, Guzman D, Riley E, Dela Cruz N, Bangsberg DR.** Community-based rapid HIV testing in homeless and marginally housed adults in San Francisco. *HIV medicine.* 2007;8(1):28-31
96. **Kagulire SC, Stamper PD, Opendi P, Nakavuma JL, Mills LA, Makumbi F, Gray RH, Serwadda D, Reynolds SJ.** Performance of two commercial immunochromatographic assays for rapid detection of antibodies specific to human immunodeficiency virus types 1 and 2 in serum and urine samples in a rural community-based research setting (Rakai, Uganda). *Clinical and vaccine immunology : CVI.* 2007;14(6):738-740
97. **Amadou A, Kouka N, Mahamane AE, Chanteau S.** [Assessment of five rapid tests and two algorithms for the HIV infection diagnosis in Niger]. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique (1990).* 2005;98(1):5-8

98. **ONUSIDA, 2013.** Guide nationale sur le diagnostic biologique de l'infection à VIH/SIDA http://www.sante.dz/jmsida2014/guide_national.pdf2013 [2 JUIN 2016].
99. **Tang MW, Shafer RW.** HIV-1 antiretroviral resistance: scientific principles and clinical applications. *Drugs.* 2012;72(9):e1-25
100. **Sterjovski J, Churchill MJ, Wesselingh SL, Gorry PR.** HIV-1 entry inhibitors: classes, applications and factors affecting potency. *Current HIV research.* 2006;4(4):387-400
101. **Mouscadet J TL, Deprez E.** Structures et rôles de l'intégrase du VIH dans le cycle viral. *HAL.* 11. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-002203992007>. p. 143-152.
102. **Menendez-Arias L.** Targeting HIV: antiretroviral therapy and development of drug resistance. *Trends in pharmacological sciences.* 2002;23(8):381-388
103. **Young FE.** The role of the FDA in the effort against AIDS. *Public health reports (Washington, DC : 1974).* 1988;103(3):242-245
104. **Sarafianos SG, Marchand B, Das K, Himmel DM, Parniak MA, Hughes SH, Arnold E.** Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition. *Journal of molecular biology.* 2009;385(3):693-713
105. **Balzarini J.** Current status of the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors of human immunodeficiency virus type 1. *Current topics in medicinal chemistry.* 2004;4(9):921-944
106. **Park J, Morrow CD.** Mutations in the protease gene of human immunodeficiency virus type 1 affect release and stability of virus particles. *Virology.* 1993;194(2):843-850
107. **Li F, Goila-Gaur R, Salzwedel K, Kilgore NR, Reddick M, Matallana C, Castillo A, Zoumplis D, Martin DE, Orenstein JM, Allaway GP, Freed EO, Wild CT.** PA-457: a potent HIV inhibitor that disrupts core condensation by targeting a late step in Gag processing. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America. 2003;100(23):13555-13560

108. **Wan H, Seth A, Rainen L, Fernandes H.** Coamplification of HIV-1 proviral DNA and viral RNA in assays used for quantification of HIV-1 RNA. *Journal of clinical microbiology.* 2010;48(6):2186-2190
109. **Ndiaye O, Diop-Ndiaye H, Ouedraogo AS, Fall-Malick FZ, Sow-Sall A, Thiam M, Diouara AA, Ndour CT, Gaye-Diallo A, Mboup S, Toure-Kane C.** Comparison of four commercial viral load techniques in an area of non-B HIV-1 subtypes circulation. *Journal of virological methods.* 2015;222:122-131
110. **Guthrie R, Susi A.** A SIMPLE PHENYLALANINE METHOD FOR DETECTING PHENYLKETONURIA IN LARGE POPULATIONS OF NEWBORN INFANTS. *Pediatrics.* 1963;32:338-343
111. **Gwinn M, Redus MA, Granade TC, Hannon WH, George JR.** HIV-1 serologic test results for one million newborn dried-blood specimens: assay performance and implications for screening. *Journal of acquired immune deficiency syndromes.* 1992;5(5):505-512
112. **Maritz J, Preiser W, van Zyl GU.** Establishing diagnostic cut-off criteria for the COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Qualitative test through validation against the Amplicor DNA test v1.5 for infant diagnosis using dried blood spots. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology.* 2012;53(2):106-109
113. **Rottinghaus EK, Ugbena R, Diallo K, Bassey O, Azeez A, Devos J, Zhang G, Aberle-Grasse J, Nkengasong J, Yang C.** Dried blood spot specimens are a suitable alternative sample type for HIV-1 viral load measurement and drug resistance genotyping in patients receiving first-line antiretroviral therapy. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2012;54(8):1187-1195
114. **Desclaux A.** [What if the HIV/AIDS pandemic were an opportunity to improve the relevance of breastfeeding promotion programs in Africa?]. *Sante.* 2002;12(1):73-75

115. **Kebe K, Thiam M, Diagne Gueye NR, Diop H, Dia A, Signate Sy H, Charpentier C, Belec L, Mboup S, Toure Kane C.** High rate of antiretroviral drug resistance mutations in HIV type 1-infected Senegalese children in virological failure on first-line treatment according to the World Health Organization guidelines. *AIDS research and human retroviruses.* 2013;29(2):242-249
116. **Aghokeng AF, Monleau M, Eymard-Duvernay S, Dagnra A, Kania D, Ngo-Giang-Huong N, Toni TD, Toure-Kane C, Truong LX, Delaporte E, Chaix ML, Peeters M, Ayouba A.** Extraordinary heterogeneity of virological outcomes in patients receiving highly antiretroviral therapy and monitored with the World Health Organization public health approach in sub-saharan Africa and southeast Asia. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2014;58(1):99-109
117. **Thiam M, Diop-Ndiaye H, Diouf AD, Vidal N, Ndiaye O, Ndiaye I, Ngom-Gueye NF, Diallo S, Diongue OD, Camara M, Seck A, Mboup S, Toure-Kane C.** HIV-1 genetic diversity and drug resistance among Senegalese patients in the public health system. *Journal of clinical microbiology.* 2013;51(2):578-584
118. **Diouara AA, Diop-Ndiaye H, Kebe-Fall K, Tchiakpe E, Ndiaye O, Ayouba A, Peeters M, Mboup S, Kane CT.** Dried blood spots for HIV-1 drug resistance genotyping in decentralized settings in Senegal. *Journal of medical virology.* 2014;86(1):45-51
119. **Compton J.** Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature.* 1991;350(6313):91-92
120. **Lubega I MM, Babirekere E, Bagenda D, Nynde L, Wabwire D, Musoke P.** Long term clinical and immunological follow up of HIV infected Uganda children on highly active antiretroviral therapy. 2nd International Workshop on HIV Pediatrics Vienna, Austria ed. http://regist2.virology-education.com/abstractbook/2010_6.pdf. Page 49. p.
121. **Vidya M, Saravanan S, Rifkin S, Solomon SS, Waldrop G, Mayer KH, Solomon S, Balakrishnan P.** Dried blood spots versus plasma for the quantitation of HIV-1 RNA using a real-Time PCR, m2000rt assay. *Journal of virological methods.* 2012;181(2):177-181

122. **Amellal B, Katlama C, Calvez V.** Evaluation of the use of dried spots and of different storage conditions of plasma for HIV-1 RNA quantification. *HIV medicine.* 2007;8(6):396-400
123. **Charpentier C, Gody JC, Tisserand P, Matta M, Fournier J, Mbitikon O, Belec L.** Usefulness of a genotypic resistance test using dried blood spot specimens in African HIV-infected children with virological failure according to the 2010-revised WHO criteria. *Archives of virology.* 2011;156(9):1603-1606
124. **Johannessen A, Garrido C, Zahonero N, Naman E, de Mendoza C.** HIV-1 drug resistance testing from dried blood spots collected in rural Tanzania using the ViroSeq HIV-1 Genotyping System. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2011;66(2):260-264
125. **Andreotti M, Pirillo M, Guidotti G, Ceffa S, Paturzo G, Germano P, Luhanga R, Chimwaza D, Mancini MG, Marazzi MC, Vella S, Palombi L, Giuliano M.** Correlation between HIV-1 viral load quantification in plasma, dried blood spots, and dried plasma spots using the Roche COBAS Taqman assay. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology.* 2010;47(1):4-7
126. **Ouma KN, Basavaraju SV, Okonji JA, Williamson J, Thomas TK, Mills LA, Nkengasong JN, Zeh C.** Evaluation of quantification of HIV-1 RNA viral load in plasma and dried blood spots by use of the semiautomated Cobas Amplicor assay and the fully automated Cobas Ampliprep/TaqMan assay, version 2.0, in Kisumu, Kenya. *Journal of clinical microbiology.* 2013;51(4):1208-1218
127. **Arredondo M, Garrido C, Parkin N, Zahonero N, Bertagnolio S, Soriano V, de Mendoza C.** Comparison of HIV-1 RNA measurements obtained by using plasma and dried blood spots in the automated abbot real-time viral load assay. *Journal of clinical microbiology.* 2012;50(3):569-572
128. **Rottinghaus E, Bile E, Modukanele M, Maruping M, Mine M, Nkengasong J, Yang C.** Comparison of Ahlstrom grade 226, Munktell TFN, and Whatman 903 filter papers for dried blood spot specimen collection and subsequent HIV-1 load and drug resistance genotyping analysis. *Journal of clinical microbiology.* 2013;51(1):55-60

129. http://www.who.int/hiv/topics/drugresistance/dbs_protocol.pdf.
130. **C. Touré-Kane HD-N SD, C. Thiombiano, N. Leye, O. Ndiaye, K. Kébé, M. Thiam, A.A.M. Diaoura, S. Mboup.** Performance of Nuclisens HIV-1 EasyQ Version 2.0 compared with HIV-1 EasyQ Version 1.2 in Sénégal. ICASA 20112011. 2011
131. **van Deursen P, Oosterlaken T, Andre P, Verhoeven A, Bertens L, Trabaud MA, Ligeon V, de Jong J.** Measuring human immunodeficiency virus type 1 RNA loads in dried blood spot specimens using NucliSENS EasyQ HIV-1 v2.0. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology.* 2010;47(2):120-125
132. **Scott LE, Noble LD, Moloi J, Erasmus L, Venter WD, Stevens W.** Evaluation of the Abbott m2000 RealTime human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) assay for HIV load monitoring in South Africa compared to the Roche Cobas AmpliPrep-Cobas Amplicor, Roche Cobas AmpliPrep-Cobas TaqMan HIV-1, and BioMerieux NucliSENS EasyQ HIV-1 assays. *Journal of clinical microbiology.* 2009;47(7):2209-2217
133. **Salou M, Dagnra AY, Butel C, Vidal N, Serrano L, Takassi E, Konou AA, Houndenou S, Dapam N, Singo-Tokofai A, Pitche P, Atakouma Y, Prince-David M, Delaporte E, Peeters M.** High rates of virological failure and drug resistance in perinatally HIV-1-infected children and adolescents receiving lifelong antiretroviral therapy in routine clinics in Togo. *Journal of the International AIDS Society.* 2016;19(1):20683
134. **Zanoni BC, Sunpath H, Feeney ME.** Pediatric response to second-line antiretroviral therapy in South Africa. *PloS one.* 2012;7(11):e49591
135. **Isaakidis P, Raguenaud ME, Te V, Tray CS, Akao K, Kumar V, Ngin S, Nerrienet E, Zachariah R.** High survival and treatment success sustained after two and three years of first-line ART for children in Cambodia. *Journal of the International AIDS Society.* 2010;13:11
136. **Zoufaly A, Fillekes Q, Hammerl R, Nassimi N, Jochum J, Drexler JF, Awasom CN, Sunjoh F, Burchard GD, Burger DM, van Lunzen J, Feldt T.** Prevalence and determinants of virological failure in HIV-infected children on antiretroviral therapy in rural Cameroon: a cross-sectional study. *Antiviral therapy.* 2013;18(5):681-690

137. **De Beudrap P, Thiam M, Diouf A, Toure-Kane C, Ngom-Gueye NF, Vidal N, Mboup S, Ndoye I, Sow PS, Delaporte E.** Risk of virological failure and drug resistance during first and second-line antiretroviral therapy in a 10-year cohort in Senegal: results from the ANRS 1215 cohort. *Journal of acquired immune deficiency syndromes.* 2013;62(4):381-387



Evaluation de la pipette de transfert dans la détermination de la charge virale du VIH-1 à partir des spots de sang séchés (DBS)

H Diop-Ndiaye¹, A Dramé¹, K Kébé-Fall¹, NA Diaw-Diouf¹, A Sow-Sall¹, AM Cissé², G Laborde-Balen³, F Niasse-Traoré⁴, O Kanté⁵, A Dia⁶, S Mboup¹, C Touré-Kane¹
¹Laboratoire de Bactériologie-Virologie, CHU Aristide le Dantec et Université Cheikh Anta DIOP de Dakar, ²EPS de Mbour, ³CRCF/ANRS/IRD U 233-INSERM U 1175, ⁴Division de Lutte contre le SIDA/IST, ⁵Centre Hospitalier Régional de Ziguinchor, ⁶Centre Hospitalier Régional de Kaolack

Problématique et Objectif

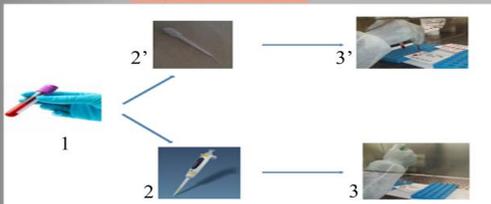
Le passage à l'échelle de la charge virale impose l'utilisation de stratégies de laboratoire innovantes en vue de faciliter l'accès à cet outil important dans le suivi de l'efficacité du traitement ARV.

Le but de cette étude est d'évaluer la pipette de transfert pour la confection de spots de sang séchés (DBS) en vue de la détermination de la charge virale du VIH-1 en comparaison avec la technique validée de la micropipette calibrée.

Methodologie

Des DBS ont été préparés dans les sites périphériques de prise en charge pédiatrique du VIH au Sénégal en déposant 3 gouttes de sang total prélevés sur tube EDTA sur chacun des cercles prédéfinis d'un papier buvard Munktell TFN (Lasec, Afrique du Sud) à l'aide d'une pipette en plastique à pointe fine, « petit bulbe, pointe longue » (Copan Diagnostics, Italy). Parallèlement, 50µl de sang total ont été déposés à l'aide d'une micropipette calibrée sur chacun des cercles prédéfinis d'une deuxième carte. Les DBS, séchés pendant 24h puis emballées et stockés à température ambiante en présence de dessiccants et de carte témoin d'humidité, ont été transférés, dans un délai maximum de 72h, au laboratoire de référence où ils ont été conservés à -80° C.

Préparation des DBS



Détermination de la charge virale

La détermination de la charge virale a été réalisée par la technique de NucliSENS EasyQ v2.0 (Biomérieux, France) à partir de 2 spots de chacun des DBS en comparaison avec ceux préparés avec la micropipette, pris comme référence. Une différence de CV > 0.5 log copies/ml entre les 2 valeurs était considérée comme significative.

Découpage DBS



Puncher 12 calibrés certifié CE (Biomérieux, France) : 2 spots /carte de différents volume

Lyse des DBS



Charge virale DBS NucliSENS EasyQ 2.0 (Biomérieux, France)

Extraction de l'ARN viral



Conclusion

Cette étude a montré que la pipette de transfert était un bon outil alternatif pour la confection des DBS en zone décentralisée permettant ainsi de lever les contraintes liées à l'utilisation d'une micropipette calibrée en vue de la détermination de la CV du VIH-1.

Résultats

La comparaison a porté sur 116 échantillons de sang prélevés chez des enfants et adolescents dans le cadre du projet EnPRISE dans 4 sites de prise en charge pédiatrique décentralisée au Sénégal.

Sites de prélèvements



Caractéristiques des patients

Sex-ratio	M/F = 0,84
Âge médian (n=71)	10 ans (1-18 ans)
1-5 ans	15
6-10 ans	27
11-18 ans	29
Traitement ARV	
2NUC +1 Non NUC	102 (87,9%)
2 NUC +1IP	8 (6,9%)
Non traité	6 (5,2%)

L'analyse des résultats de CV a montré une concordance pour 96,5% des échantillons (n=112) avec 64 (55,1 %) patients présentant une CV > 2,9 log copies/ml (seuil de NucliSENS) et une valeur médiane de 3.78 log copies/ml (extrêmes : 3,00-5,76 log copies/ml).

CV sur DBS -micropipette

Classification des CV	Intervalles de valeurs (en copies/ml)	Intervalles de valeurs (en log)	N
Indétectable	0 - 800	0 - 2.9 log	52
Moyenne	801 - 5000	2.9 - 3.7log	30
Elevée	> 5000	> 3.7 log	34
Total			116

CV sur DBS -pasteurette

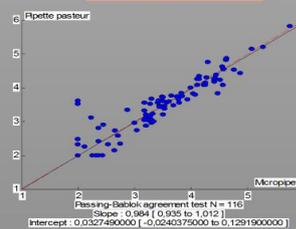
Classification des CV	Intervalles de valeurs (en copies/ml)	Intervalles de valeurs (en log)	N
Indétectable	0 - 800	0 - 2.9 log	50
Moyenne	801 - 5000	2.9 - 3.7log	32
Elevée	> 5000	> 3.7 log	34
Total			116

Charge virale micropipette vs pipette pasteur

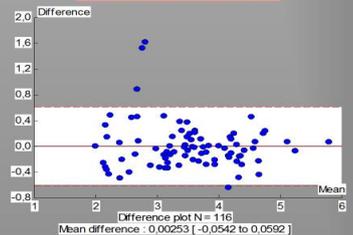
Δlog DBSµP - DBSPP	
Δlog ≤ +/-0,3	93
+/- 0,3 ≤ Δlog ≤ +/-0,5	19
+/-0,5 ≤ Δlog ≤ +/-1	2
> +/-1	2

L'analyse de la droite de régression linéaire et le diagramme de Bland Altman ont montré une bonne corrélation (R= 0,95 ; pente = 0,98) et une bonne concordance biais= + 0,00253 [- 0,0542 à + 0,0592].

Droite de régression



Courbe de concordance



Discussion

L'analyse de la droite de régression linéaire et le diagramme de Bland Altman ont montré une bonne corrélation (R= 0,99 ; pente = 0,97) et une bonne concordance (biais= +0,00253 [-0,0145 à 0,0196]).

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes Condisciples.

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

D'exercer, dans l'intérêt de la Santé Publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'Honneur, de la Probité et du Désintéressement.

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

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

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

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

PERMIS D'IMPRIMER

Vu :

Le président du jury

Vu :

Le Doyen.....

Vu et Permis d'imprimer

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

Le Doyen

EVALUATION DE LA PIPETTE DE TRANSFERT ET SON APPLICATION DANS LE MONITORING DU VIH EN MILIEU DECENTRALISE AU SENEGAL (Etude EnPRISE)

RESUME

Problématique :

Le passage à l'échelle de la charge virale impose l'utilisation de stratégies de laboratoire innovantes en vue de faciliter l'accès à cet outil important dans le suivi de l'efficacité du traitement ARV. Le but de cette étude est d'évaluer la pipette de transfert (pipette pasteur à bout fin 222C) comme outil alternatif à la micropipette pour la confection des spots de sang séchés DBS et de mesurer l'efficacité virologique chez les enfants infectés par le VIH en milieu décentralisé au Sénégal dans le cadre du projet EnPRISE.

Méthodologie :

Il s'agit d'une étude prospective réalisée en deux phases. La première phase évaluant la pipette de transfert a porté sur les 116 premiers échantillons de DBS confectionnés en parallèle avec la pipette de transfert en déposant 3 gouttes de sang total et avec la micropipette en déposant 50µl de sang total (outil de référence). La deuxième phase a estimé le taux d'échec virologique chez des enfants (n=666) vivant avec le VIH en milieu décentralisé pour lesquels un prélèvement sur DBS avait été réalisé. Sur site, les échantillons ont été séchés à l'abri de la lumière pendant 24h à température ambiante puis acheminés au Laboratoire de Bactériologie-Virologie du CHU Aristide le Dantec dans un délai maximum de 10 jours par transport en commun. La quantification de la charge virale (CV) a été effectuée par la technique du NucliSENS EasyQ (Laboratoires Biomérieux, France). La droite de régression et le graphe de Bland-Altman ont permis d'apprécier respectivement la corrélation et la concordance entre les deux outils. Le taux d'échec virologique a été déterminé en se basant sur les recommandations 2013 de l'OMS (CV>1000 copies/ml).

Résultats :

La comparaison des valeurs de charge virale obtenues entre DBS confectionnés avec la micropipette et avec la pipette de transfert a été faite sur la base de leur différence de log. Seuls 4 échantillons avaient présenté une discordance avec une différence de log $\geq \pm 0,5$ (comprise entre $\pm 0,88$ et $\pm 1,62$). Ces 4 échantillons discordants ont été confirmés par le graphe de Bland-Altman en se positionnant en dehors de la limite de confiance avec un biais très faible de **0.00253 [- 0,0542 à + 0.0592]** et un coefficient de corrélation **R= 0,95**.

Parmi les 666 enfants testés, 601 étaient sous TARV et 498 depuis au moins 6 mois avec une médiane de suivi de 28 mois [6-191]. Le taux d'échec virologique était de 64% (320/498) avec une prépondérance des enfants suivis de 6 à 12 mois sous le schéma AZT+3TC+NVP/EFV

Conclusion :

Ces résultats montrent que la pipette pasteur constitue une bonne alternative à la micropipette pour la confection des DBS destinés à la CV pour le monitoring virologique. D'autre part, nos travaux ont montré un taux d'échec virologique très élevé chez les enfants suivis en milieu décentralisé soulignant ainsi la question de l'importance de la disponibilité de la charge virale dans toutes les régions.

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

M. ABOUBACRY DRAME