

**MINISTRE DES ENSEIGNEMENTS SECONDAIRE
SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
(MESSRS)**

**BURKINA FASO
Unité – Progrès - Justice**

SECRETARIAT GENERAL

UNIVERSITE POLYTECHNIQUE DE BOBO-DIOULASSO

INSTITUT DE DEVELOPPEMENT RURAL

**DEA DE BIOLOGIE APPLIQUEE ET MODELISATION DES
SYSTEMES BIOLOGIQUES (DEA BA-MSB)**

ANNEE UNIVERSITAIRE 2008-2009



Mémoire N°

**INTERET DES PAPIERS FILTRES (DBS) POUR LA
QUANTIFICATION DE LA CHARGE VIRALE ARN VIH-1
DANS LE SANG TOTAL : COMPARAISON AVEC LES
RESULTATS PLASMATIQUES**

MEMOIRE

Présentée et soutenue publiquement le 12 Mai 2010

Pour l'obtention du

**DIPLOME D'ETUDE APPROFONDIE (DEA) DE BIOLOGIE APPLIQUEE ET DE MODELISATION
DES SYSTEMES BIOLOGIQUES**

Par

Mme KOUASSI Sandrine Estelle née GAMPINI

Née le 07 Septembre 1977 à Abidjan (Côte d'Ivoire)

DIRECTEUR DE MEMOIRE

JURY

Pr OUEDRAOGO Rasmata / Traoré

président : Pr Jean Bosco OUEDRAOGO

CO-DIRECTEUR

Membre : Pr Georges Anicet OUEDRAOGO

Dr ROUET François

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

3TC :	stavudine
ADN :	acide désoxyribonucléique
ANRS :	agence nationale de recherche sur le SIDA, les Hépatites B et C
ARN :	acide ribonucléique
ARNm :	acide ribonucléique messenger
ARV :	antiretroviral
AUG:	adenine uracile guanine
bdNA :	branched-chain DNA
CRF:	circulating recombinant form
CV :	charge virale
DBS :	dried blood spots
FRET:	fluorescence resonance energy transfer
HAART :	highly active antiretroviral treatment
HTLV :	human T-lymphotropic virus
LP/r :	lopinavir bousté à la ritonavir
LTR:	long terminal repeat
NASBA:	nucleic acid sequence based amplification
NVP :	névirapine
OMS :	organisation Mondiale de la Santé
ONUSIDA :	organisation des Nations Unies pour le SIDA
PA :	phosphatase alcaline
PCR :	polymerase chain reaction
PED :	pays en développement
PI:	primo-infection
PTME :	prévention de la transmission mère enfant du VIH
PVVIH :	personnes vivant avec le VIH
RT- PCR :	reverse transcriptase polymerase chain reaction
SIDA :	syndrome d'immunodéficience acquise
SIV :	simian immunodeficiency virus
TI:	transcriptase inverse
UNICEF :	organisation des nations unies pour l'enfance
VIH-1 :	virus de l'immunodéficience acquise de type 1
VIH-2 :	virus de l'immunodéficience acquise de type 2
ZDV :	zidovudine

Sommaire

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS.....	II
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	V
DEDICACE ET REMERCIEMENTS	VI
A NOS MAITRES	VIII
ET JUGES.....	VIII
Résumé.....	X
INTRODUCTION.....	1
ENONCE DU PROBLEME.....	5
PREMIERE PARTIE :.....	8
GENERALITES.....	8
I. STRUCTURE ET CLASSIFICATION DES VIH.....	9
I.1 Aspects structuraux.....	9
I.2 Organisation génétique.....	10
I.3 Variabilité génétique et classification des VIH.....	11
II. SITUATION DU SIDA DANS LE MONDE.....	13
II.1 Epidémiologie.....	13
II.2 Distribution géographique du VIH.....	14
III. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFECTION A VIH.....	14
III.1 Modes de transmission du VIH.....	14
III.2 Réplication du VIH.....	15
III.3 Evolution physiologique de l'infection à VIH-1.....	18
IV. QUANTIFICATION DU VIH-1 OU CHARGE VIRALE.....	20
IV.1 Définition.....	20
IV.2 Techniques de quantification du VIH-1.....	20
IV.2.1 Techniques d'amplification de la cible (ARN ou ADN proviral).....	21
V. PAPIERS FILTRE (DBS) DANS LE DIAGNOSTIC ET LE SUIVI DE L'INFECTION A VIH.....	27
V.1 Prélèvement sur papier filtre.....	28
V.2 Stockage, transport, et conservation des DBS.....	29
DEUXIEME PARTIE :.....	30
NOTRE ETUDE.....	30
I. OBJECTIFS.....	31

II. METHODOLOGIE.....	32
RESULTATS.....	40
I. PERFORMANCES ANALYTIQUES DES DBS.....	41
I.1 Limite de détection de la technique appliquée au DBS.....	41
I.2 Répétabilité intra-essai.....	41
I.3 Reproductibilité inter-essai.....	41
I.4 Impact de la durée de conservation des DBS sur la fiabilité des résultats obtenu par les DBS.....	42
II. EVALUATION CLINIQUE DES DBS.....	42
II.1 Diagnostic précoce des enfants exposés au VIH :.....	42
II.2 Corrélation et concordance des charges virale ARN VIH-1 plasmatique et DBS chez les enfants infectés.....	43
II.3 Corrélation et concordance des charges virales plasmatiques et DBS chez les mères séropositives.....	44
II.4 Cinétique de la charge virale plasmatique et DBS dans le suivi thérapeutique.....	45
DISCUSSION.....	46
I. PERFORMANCE ANALYTIQUE DES DBS.....	47
I.1 Limite de détection de la technique appliquée au DBS.....	47
I.2 Répétabilité intra-essai.....	47
I.3 Reproductibilité inter-essai.....	47
I.4 Impact de la durée de conservation des DBS sur la fiabilité des résultats obtenus par les DBS.....	48
II. EVALUATION CLINIQUE DES DBS.....	48
II.1 Diagnostic précoce des enfants exposés au VIH.....	48
II.2 Corrélation et concordance des CV plasmatiques et DBS.....	49
II.3 Cinétique de la charge virale plasmatique et DBS dans le suivi thérapeutique.....	49
LES RECOMMANDATIONS ET SUGGESTIONS.....	51
CONCLUSION.....	52
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	53

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Liste des figures

Figure 1: Structure du VIH-1(8)	10
Figure 2: Organisation génétique du VIH-1 (18)	11
Figure 3 : Etapes de réplication du VIH dans une cellule (8).....	18
Figure 4: Cinétique des marqueurs viraux au cours de l'infection à VIH-1 sans traitement ...	19
Figure 5: RT PCR par Amplicor HIV Monitor v1.5 Roche Diagnostic	22
Figure 6: Différentes phases d'amplification d'une PCR en temps réel (3).....	23
Figure 7: Principe de fonctionnement d'une sonde TaqMan (3).....	24
Figure 8: Etapes d'amplification dans la technique NASBA (28).....	26
Figure 9: Principe de fonctionnement d'une balise moléculaire (28).....	26
Figure 10 : Corrélation des charges virale ARN VIH-1 plasmatique et DBS chez les enfants infectés par le VIH-1.....	43
Figure 11: Bland-Altman, différence entre les concentrations d'ARN VIH-1 plasma et DBS chez les enfants infectés	43
Figure 12 : Corrélation des charges virale ARN VIH-1 plasmatique et DBS chez les mères infectées par le VIH-1 sans traitement ARV.....	44
Figure 13: Bland-Altman, différence entre les concentrations d'ARN VIH-1 plasma et DBS chez les mères infectées par le VIH-1 sans traitement ARV.....	44
Figure 14: Comparaison de la cinétique des charges virales ARN VIH-1 plasmatique et DBS dans le suivi thérapeutique chez 13 femmes sous HAART.....	45

Liste des tableaux

Tableau 1: Tests commerciaux utilisés pour la quantification de l'ARN VIH-1 (25)	27
Tableau 2: Prélèvement de plasma et de DBS réalisés chez les mères incluses dans l'essai Kesho Bora, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso (2005-2008).....	33
Tableau 3 : Prélèvements de plasma et de DBS réalisés chez les enfants nés de mères incluses dans l'essai Kesho-Bora, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso (2005-2008).	34
Tableau 4: seuil de sensibilité de la technique appliquée aux DBS.....	41
Tableau 5 : Sensibilité et spécificité des DBS pour le diagnostic précoce de l'infection à VIH chez des enfants exposés nés de mères infectées par le VIH-1.....	42

DEDICACE ET REMERCIEMENTS

DEDICACE

Je dédie ce travail à ma famille mon époux et mes enfants qui ont été une source de réconfort et de soutien pendant toute la formation.

A mes parents dont les prières et les encouragements m'ont toujours accompagné

A mes frères et sœurs Alain, Hélène, Eric, Emmanuela, Jacques

A toute la promotion du DEA pour l'entente chaleureuse qui a régné pendant les cours

REMERCIEMENTS

Je voudrais adresser des sincères remerciements à toute l'équipe du Laboratoire de Virologie du Centre Muraz à qui je dois le fruit de ce travail et plus particulièrement au Dr Rouet François qui a accepté partager son expérience et ses connaissances dans le domaine du VIH.

J'ai également une pensée pour mes collègues et amis Dr Ouangraoua Soumeya, Dr Bado Guillaume, Dr Da just, Dr Diallo Souleyman, Dr Kaboré Jean, Dr Gomgnimou Michel, Dr Zingué Dezemon, Dr Zida Silvie, Dr Ouiminga Adama.

**A NOS MAITRES
ET JUGES**

A notre Maître et Directrice de mémoire

Pr Rasmata OUEDRAOGO/TRAORE

Professeur titulaire de Bactériologie-virologie à l'UFR/SDS

Chef du département des Sciences Biologiques et appliquées à l'UFR/SDS

Chef de service du laboratoire d'analyses biomédicales du CHU-CDG

Chère Maître, vous avez permis la réalisation de cette étude que vous avez bien voulu dirigée en dépit de vos multiples occupations. C'est un immense privilège que vous nous faites.

Nous avons été séduits par vos connaissances scientifiques, vos qualités pédagogiques et votre rigueur dans le travail.

Veillez bien trouver en ce travail la reconnaissance de votre souci du travail bien fait.

A notre Maître et Président du jury

Pr Jean Bosco OUEDRAOGO

Professeur titulaire de Parasitologie

Enseignant-Chercheur IRSS-Centre Muraz

Directeur Général du Centre Muraz

Cher Maître vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider le jury de soutenance de notre mémoire.

Nous avons bénéficié de vos compétences scientifiques tout au long de cette formation universitaire. Votre rigueur dans le travail a été pour nous un exemple. Puisse notre travail être à la hauteur de vos attentes.

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

A notre maître et juge

Pr Georges Anicet OUEDRAOGO

Professeur titulaire de Biochimie

Directeur Général du CAP de Matroukou

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail. Voici l'occasion pour nous de vous dire merci pour le DEA BAMS que vous avez initié au sein de l'UPB. Votre souci pour le travail bien fait et votre sens de la disponibilité force le respect. Sincèrement merci.

Résumé

Titre : Intérêt des papiers filtres (DBS) pour la quantification de la charge virale ARN VIH-1 dans le sang total : comparaison avec les résultats plasmatiques

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

Objectif : il s'agissait pour nous d'évaluer l'intérêt du papier filtre dans la quantification de l'ARN VIH-1 chez des personnes infectées et sous traitements ARVs

Méthode : nous avons réalisés une étude analytique et clinique rétrospective utilisant la bibliothèque DBS de l'essai Kesho-Bora de PTME VIH-1 à Bobo-dioulasso. A partir des prélèvements de sang total recueilli sur des tubes EDTA, les DBS ont été confectionnés au Laboratoire de Virologie du Centre Muraz (conservé à -20°C) ainsi que des allcots de plasma (conservé à -80°C). Des mesures des charges virales ARN VIH-1 ont été réalisées sur le plasma et les DBS de même patient à différentes visites. L'extraction de l'ARN VIH-1 a été réalisé (i) sur plasma par la technique de QIAGEN (ii) sur les DBS par la technique Boom de NucliSens sur MiniMag (BioMérieux). L'amplification/détection par le Kit Generic HIV charge virale (Biocentric). Les DBS des mères sous ARV ont été pré-traités à la DNase avant l'amplification/détection afin d'éliminer l'ADN résiduel.

Résultats : nous avons obtenu une bonne performance analytique des DBS avec un seuil de détection à **1550 copies/ml ($3,17 \log_{10}$)** par emploi de 2 spots de $50\mu\text{l}$ de sang total. La répétabilité et la reproductibilité étaient respectivement de **3,65 (SD, $\pm 0,23$) \log_{10}/ml** et **3,32 (SD, $\pm 0,30$) \log_{10}/ml** . Une période de [2-1318] jours de conservation à -20°C n'avait pas d'impact significatif sur les valeurs des CV DBS. L'évaluation clinique a porté sur 326 DBS. La comparaison des mesures de CV plasmatique et DBS donne des Corrélatons de 0,89 et 0,82 respectivement chez les enfants ($n=210$) et les mères ($n=91$) avec une bonne concordance des valeurs. La sensibilité et la spécificité étaient de 100% chez les enfants et 97,8% de sensibilité chez les mères. Les sous traitement ARV ($n=25$) le pré-traitement des DBS avec la DNase a permis de ramener les CV à l'indétectable chez celles qui étaient en succès virologique avec le plasma.

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

INTRODUCTION

Le **Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)** est responsable du **Syndrome d'Immunodéficience Acquis (SIDA)**. Il constitue un véritable fléau de Santé Publique touchant adultes, adolescents et enfants. L'ONUSIDA estimait à 33,2 millions [30,6–36,1 millions] le nombre de personnes vivant avec le VIH (PVVIH) dans le monde en 2007 (43). La découverte de ce rétrovirus humain remonte maintenant à 26 ans. Elle a valu à ses découvreurs (Dr Françoise Barré-Sinoussi et Pr Luc Montagnier, Institut Pasteur, Paris, France) la remise du Prix Nobel de Médecine en 2008 (5).

Dans les pays du Nord, depuis 1996, date de l'avènement des « **trithérapies** » combinant au moins trois médicaments antirétroviraux (ARV) (13), des progrès considérables ont été effectués dans le traitement de l'infection à VIH-1. Les multithérapies antirétrovirales bloquent la réplication virale, retardent la progression de la maladie et réduisent considérablement (de l'ordre de 80%) la mortalité et la morbidité liées au VIH-1. L'**ARN VIH-1 plasmatique** constitue un marqueur biologique pronostique important de l'infection à VIH/SIDA, indépendamment de l'ADN proviral VIH-1 et du taux de lymphocytes T CD4⁺ (25, 30, 31). Dans les pays industrialisés, les tests permettant la mesure de la **charge virale (CV) ARN VIH-1 plasmatique** par **PCR** (polymerase chain reaction), en association avec la détermination du taux des **lymphocytes T CD4⁺**, sont périodiquement utilisés en routine pour déterminer le moment approprié pour instaurer un traitement ARV, pour évaluer l'efficacité du traitement et le moment opportun pour en changer en cas d'échec du précédent traitement.

En outre, ces tests de mesure de la CV ARN VIH-1 plasmatique sont des outils essentiels pour le **diagnostic de l'infection à VIH-1** dans les situations où les tests sérologiques ne sont pas utiles, telle l'infection pédiatrique (21). Le dépistage systématique du VIH chez les femmes enceintes, la prise de médicaments antirétroviraux par la mère séropositive pendant la grossesse, durant l'accouchement, et en période post-partum, ainsi que les **césariennes électives** ont permis de réduire le **taux de transmission mère enfant du VIH-1** autour de 1% dans les pays industrialisés (44).

En Afrique sub-saharienne, la situation sanitaire par rapport à la pandémie VIH est bien différente. Selon l'ONUSIDA, **l'Afrique sub-saharienne est la région la plus touchée** avec environ 22,5 millions [20,9-24,3] de personnes infectées, dont 15,4 millions [13,9-16,6] de femmes. Environ 90% des enfants séropositifs vivent en Afrique subsaharienne et le VIH/SIDA reste l'une des principales causes de mortalité et de morbidité chez le nourrisson et l'enfant en Afrique. Le SIDA est déjà responsable d'une augmentation de la mortalité de plus de 19% chez le nourrisson et de 36% chez l'enfant de moins de cinq ans. Les bénéfices des avancées spectaculaires en terme de soins et de suivi biologique n'ont donc pas atteint la très grande majorité des sujets infectés par le VIH-1 qui vivent dans les pays en développement (PED) (42).

Cependant, depuis environ 5 ans, des progrès très significatifs en matière d'accès au traitement (et/ou à la PTME) des PVVIH vivant dans les PED ont été initiés par l'OMS, l'ONUSIDA, l'UNICEF et d'autres bailleurs de fond internationaux et nationaux. Approximativement 3 millions de PVVIH dans les pays à faibles ressources reçoivent des traitements ARV en 2007. Le nombre d'enfants sous traitement ARV est passé de 75.000 en 2005 à 200.000 en 2007 avec un accroissement de plus de 150%. Les sites de dispensation des ARV ont doublé entre 2005 et 2007 (de 4.000 à 10.000); Enfin, 33% des femmes enceintes ont reçu des traitements pour la PTME en 2007 contre 10% en 2004 (45).

Depuis ces cinq mêmes dernières années, c'est très certainement dans le domaine de l'accès au suivi biologique des personnes infectées par le VIH-1 ($CD4^+$, CV) que les progrès sont les plus notablement insuffisants. La mesure de l'ARN VIH-1 plasmatique (appelé communément charge virale) est pourtant un examen essentiel pour permettre de façon fiable le suivi virologique des adultes et enfants sous traitement ARV. Cet examen est aussi un test essentiel pour le dépistage précoce de l'infection à VIH-1 chez les nourrissons de moins de 18 mois. Bien que les traitements ARV soient aujourd'hui décentralisés dans les centres de santé régionaux, les tests de laboratoires spécifiques restent centralisés à quelques sites.

La mesure de l'ARN VIH-1 plasmatique nécessite un équipement coûteux, un personnel qualifié et des conditions particulières de prélèvement (prélèvement veineux au pli du coude), de conservation (respect de la chaîne du froid), de transport (tubes en verre EDTA) et de stockage ($-80^{\circ}C$) des échantillons. Tous ces éléments constituent des barrières importantes à un accès élargi à la mesure de l'ARN VIH-1. Il existe donc un besoin urgent de trouver des moyens plus simples permettant aux enfants exposés au VIH et aux adultes identifiés dans les structures de santé primaires d'avoir accès à ce test à partir des laboratoires de référence.

La technique de prélèvement sur papiers filtres (couramment appelés DBS en anglais pour Dried Blood Spots) pour réaliser la mesure de la CV de l'ARN VIH-1 à partir de sang total pourrait constituer une alternative intéressante aux prélèvements et mesures dans le plasma. La réalisation du prélèvement peut se faire au talon ou au bout du doigt. Après dépôt d'une goutte de sang total sur un papier filtre, celui-ci, après séchage, peut être transporté sans nécessité de réfrigération à un laboratoire à proximité. Il est alors conservé à $-20^{\circ}C$. De fait, cette stratégie devrait permettre de réaliser le diagnostic précoce de l'infection à VIH-1 chez les enfants et d'évaluer la réponse virologique chez les patients traités par ARVs, à partir de structures décentralisées. La quantification de la charge virale sur papier filtre est réalisée sur du sang total. Une technique d'extraction permet d'isoler les particules d'acide nucléique du VIH-1 présentes dans les échantillons avant l'amplification par RT-PCR en temps réel.

Malheureusement, à ce jour, relativement peu d'études ont été menées en Afrique sub-saharienne afin de déterminer si cette stratégie d'emploi des DBS est fiable et faisable sur le terrain. Les résultats de ces études sont parfois anciens, souvent réalisés sur de petits échantillons, et ont fait l'objet de controverses.

Notre étude vise à déterminer la sensibilité, la spécificité et le coefficient de corrélation de l'utilisation des papiers filtres comparés au plasma pour le diagnostic des enfants exposés au VIH mais aussi pour le suivi des mères séropositives de l'essai Kesho-Bora.

ENONCE DU PROBLEME

Le Burkina Faso est situé au cœur de l'Afrique de l'ouest, sa position géographique fait de lui un important carrefour migratoire. Le pays compte environ 14 017 262 habitants en 2006 (18) pour une superficie de 274 000 Km². Le Burkina Faso présente l'un des profils sanitaires les plus faibles de l'Afrique de l'Ouest. En effet les taux bruts de mortalité (11,8 pour 1000) et de natalité (46 pour 1000) demeurent très élevés (17). La population du Burkina Faso est très jeune avec environ 56% de sujets ayant moins de 20 ans (18). Le taux de fréquentation des centres de santé est relativement bas lié à une insuffisance et à l'éloignement de ces centres. Les ressources humaines et matérielles sont également déficientes. Les coûts des soins de santé et des médicaments sont parfois inaccessibles aux populations. Le manque d'information de la population, l'absence de régime de protection sociale, les difficultés d'accès à l'eau potable, l'insalubrité de l'environnement, la malnutrition sont autant de problèmes qui minent le système sanitaire du pays.

À cette problématique, s'ajoute l'expansion rapide de l'infection du VIH/SIDA. Le Burkina Faso est l'un des pays de l'Afrique de l'Ouest les plus affectés par la pandémie du VIH/SIDA. En effet avec un taux de prévalence de 2,0%, le Burkina Faso compte environ 150 000 PVVIH dont 80 000 Femmes (15 à 49 ans) et 17 000 enfants de moins de 15 ans en 2006 (33).

Cependant, il faut noter une baisse significative de la prévalence du VIH dans le pays. En effet, avec l'aide de la société civile et de ses partenaires multilatéraux, le gouvernement a élaboré un plan national multisectoriel de lutte contre le VIH/SIDA et les IST qui comprend : un programme de prévention par la sensibilisation sur les comportements à risque, la promotion du dépistage volontaire et la prise en charge globale des PVVIH (thérapeutique et psycho-social). Un programme national de prévention de la transmission du VIH de la mère à l'enfant a été mis en place et comprend une chimio prophylaxie à la Névirapine et un allaitement artificiel ou limité à quelques mois (1). Ces efforts ont permis de réduire la prévalence du VIH de 7,2% en 1997 à 2,0% en 2007(33).

Au Burkina, le diagnostic biologique du VIH est basé sur les tests sérologiques de dépistage des anticorps anti-VIH chez les adultes et les enfants âgés de plus de 18 mois. Chez les nourrissons de moins de 18 mois, la présence des anticorps anti-VIH maternelles spécifiques acquis *in utero* ne permet pas d'utiliser ce dépistage sérologique classique. Pour le diagnostic pédiatrique, les laboratoires doivent faire des tests virologiques telle que la quantification de la charge virale plasmatique par PCR en temps réel (12, 42)

Au Burkina Faso, seulement cinq centres sont capables de réaliser les tests virologiques de diagnostic pédiatrique précoce et de suivi des patients sous traitement ARV par la mesure de la charge virale plasmatique. En effet, ces tests nécessitent des conditions particulières de prélèvements, de conservation, de transport, et de stockage des échantillons, surtout quand les patients sont éloignés de ces centres (20) (28)

Au regard de toutes ces difficultés, des spots de sang total sur les papiers filtres sont proposés pour faciliter la réalisation de cet examen.

Notre étude, réalisée dans le cadre de l'essai de PTME appelé OMS/ANRS 1289 Kesho Bora mené à Bobo-Dioulasso (Burkina Faso), a pour **objectif** d'évaluer l'intérêt des papiers filtres pour réaliser la mesure de l'ARN VIH-1 dans le sang total. Les résultats obtenus avec les DBS vont être comparés avec les valeurs obtenues dans le compartiment plasmatique. La finalité de notre étude est de savoir si les DBS peuvent être employés de façon fiable pour réaliser le diagnostic précoce de l'infection pédiatrique à VIH-1 et le suivi virologique des mères séropositives traitées par ARVs.

**PREMIERE PARTIE :
GENERALITES**

I. STRUCTURE ET CLASSIFICATION DES VIH

Les virus de l'immunodéficience humaine appartiennent à la famille des Rétrovirus. Ils sont largement répandus dans le monde animal et se définissent essentiellement par leur mode de répllication. La présence d'une enzyme, la **transcriptase inverse**, permettant la rétrotranscription de l'ARN en ADN caractérise ces virus.

La famille des rétrovirus se divise en trois sous familles selon des critères de pathogénie, mais aussi selon des paramètres phylogénétiques :

- Les **oncovirus** à ARN sont les rétrovirus de type HTLV (human T-lymphotropic virus) les plus répandus. Ils sont associés à des tumeurs et à des leucémies. Quatre types de HTLV ont été caractérisés à ce jour : les HTLV-1, HTLV-2, HTLV-3, et HTLV-4.
- Les **lentivirus** sont des virus qui provoquent des maladies à évolution lente et qui sont cytopathogènes en culture. Les VIH, agents responsables du SIDA, font partie de cette sous-famille ; deux types de virus ont été identifiés à ce jour : le VIH-1, répandu sur tous les continents, et le VIH-2 présent essentiellement en Afrique de l'ouest. Les lentivirus sont aussi retrouvés chez de nombreux mammifères (mouton, chat, cheval....) ainsi que chez plus de quarante espèces de singes en Afrique (singes verts, mangabés, cercopithèques, chimpanzés, gorilles...) lesquels sont dénommés SIV « Simian Immunodeficiency Virus ».
- Les **spumavirus** sont des virus identifiés chez de nombreux mammifères, mais ils ne sont associés à aucune pathologie connue chez l'homme et l'animal.

I.1 Aspects structuraux

Les rétrovirus, se présentent sous forme de particules sphériques d'un diamètre de 80 à 100 nm. Ces particules sont constituées d'une enveloppe d'origine cellulaire dans laquelle sont insérées les glycoprotéines d'enveloppe du virus. L'enveloppe est tapissée à l'intérieur de la particule virale par une matrice qui entoure la capsid virale contenant: le génome viral, la nucléocapsid et les enzymes nécessaires à la répllication du virus. Les particules virales sont libérées par bourgeonnement à la surface des cellules infectées.

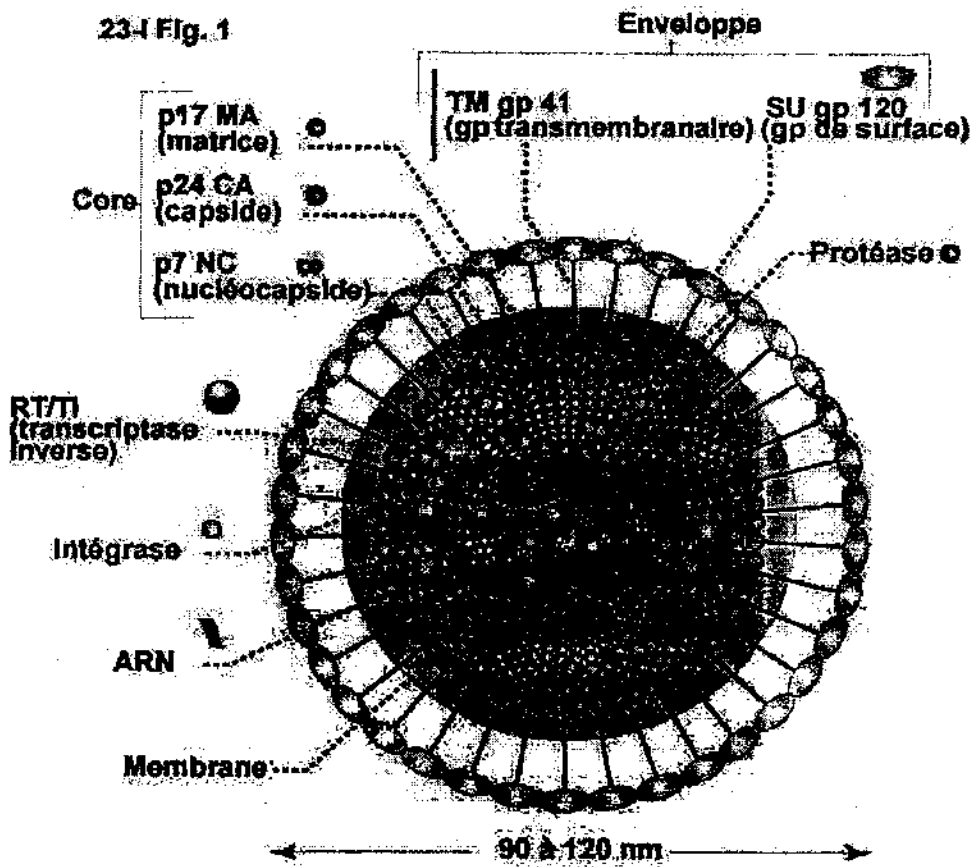


Figure 1: Structure du VIH-1(9)

1.2 Organisation génétique

Le génome des rétrovirus est constitué d'au moins trois régions appelées *gag*, *pol* et *env*, qui codent respectivement les protéines internes du virion, les enzymes nécessaires à la réplication et les protéines de surface du virion (36). A partir de ces trois gènes, des précurseurs polyprotéiques sont synthétisés dans la cellule infectée, où ils sont clivés en protéines internes par une protéase virale et en protéines d'enveloppe par des protéases cellulaires.

Le gène *gag* code pour les précurseurs Pr160 *gag-pol*, Pr55*gag* et Pr40 *gag* qui sont clivés en protéine de la matrice (p18), de la capside (p24) et de la nucléocapside (p7- p8).

Le gène *pol* code les protéines virales à activité enzymatique. Le précurseur est le Pr160 *gag-pol* p24, il s'agit de la transcriptase inverse sous forme d'hétérodimère (p51-p66), de l'intégrase (p32) et de la protéase (p12).

Le gène *env* synthétise un précurseur glycosylé intracellulaire de 160 KDa appelé gp 160 qui sera par la suite clivé en glycoprotéine de surface gp120 et en glycoprotéine

Au sein de chaque type existent plusieurs groupes, qui à leur tour comportent des sous-types.

Le VIH-1 est classé depuis 1998 en quatre groupes, dont chacun correspondrait à des transmissions indépendantes de SIV à l'Homme :

- groupe M (pour major group), responsable de la pandémie actuelle,
- groupe O (pour outlier group), présent en Afrique Centrale,
- groupe N (pour non-M, non-O group), présent au Cameroun,
- groupe P, récemment identifié chez une patiente camerounaise vivant en France (Plantier JC et al, Nature Médecine, 2009).

Le groupe M est actuellement subdivisé en 9 sous-types (A, B, C, D, F, G, H, J, K) et plus de 40 formes recombinantes. Le sous type A est subdivisé en sous-sous-type A1, A2 et plus récemment A3 et A4. Le sous-type F est lui-même subdivisé en sous-sous-type F1 et F2. (24) ,(26)

A cela s'ajoutent plusieurs formes recombinantes (en anglais, circulating recombinant form ou CRF), qui ont pour origine la multiple infection d'une cellule par des sous-types différents, ce qui entraîne des phénomènes de recombinaison au sein des génomes viraux. Les CRF les plus fréquemment retrouvées sont le CRF01-AE (recombinaison entre les virus de sous-type A et les virus de sous-type E) et le CRF02-AG (recombinaison entre les virus de sous type A et les virus de sous-type G). De très nombreuses formes recombinantes ne correspondant pas aux critères de classification sont appelés URF (unique recombinant forms). Ces formes recombinantes proviennent d'évènement de recombinaison intervenue lors de la rétrotranscription de leur ARN dans une cellule co-infectée par différent sous types.(24, 26)

Bien que la variabilité génétique au sein d'un même groupe ne semble pas modifier de manière significative la pathogénicité et la progression de l'infection, elle pose de sérieux problèmes pour la mise au point d'un vaccin efficace sur tous les groupes et souches du VIH, pour les mesures de la charge virale et dans certains cas particuliers pour la réalisation fiable des tests sérologiques VIH (38). Dans ce dernier cas, c'est ainsi que les tests de dépistage basés sur des antigènes du VIH-1 de sous-type B et du VIH-2 de sous-type A, peuvent présenter une sensibilité moindre pour la reconnaissance des autres sous-types, particulièrement lors de la primo-infection ou d'infection par des variants comme les VIH-1 du groupe O (38) Les tests commerciaux ont été modifiés en conséquence pour pallier à cette difficulté..

II. SITUATION DU SIDA DANS LE MONDE

II.1 Epidémiologie

De nouvelles données montrent que la prévalence mondiale du VIH et le pourcentage de personnes vivant avec le VIH (PVVIH) se sont stabilisés. Le nombre de nouvelles infections a chuté, partiellement en raison de l'impact des programmes de lutte contre le VIH. Toutefois, on estime en 2007 que 33,2 millions [30,6 – 36,1 millions] de personnes vivent avec le VIH, que 2,5 millions [1,8 – 4,1 millions] de personnes ont été nouvellement infectées et que 2,1 millions [1,9 – 2,4 millions] de personnes sont décédées du sida.(34) (32)

L'Afrique subsaharienne reste la région la plus sévèrement touchée avec 22,5 millions [20,9 – 24,3 millions] de PVVIH, soit 68% du total mondiale. Depuis 2001 le nombre de PVVIH en Europe orientale et en Asie centrale a augmenté de plus de 150 %, passant de 630 000 [490 000 – 1,1 million] à 1,6 million [1,2 – 2,1 millions] en 2007. En Asie, le nombre de PVVIH au Vietnam a plus que doublé entre 2000 et 2005, et l'Indonésie connaît l'épidémie dont la croissance est la plus rapide. (34)

L'estimation de 13,8 millions [12,7 millions -15,2 millions] de femmes vivant avec le VIH en 2001 a augmenté de 1,6 million pour atteindre 15,4 millions [13,9 millions-16,6 millions] en 2007 ; les chiffres correspondants pour les hommes sont de 13,7 millions [12,6 millions-15,2 millions] en 2001 et 15,4 millions [14,3 millions-17,0 millions] en 2007. En Afrique subsaharienne, près de 61% des adultes vivant avec le VIH en 2007 étaient des femmes, et 43% dans les Caraïbes (à comparer aux 37% de 2001). En Europe orientale et en Asie centrale, on estime que les femmes représentaient 26% des adultes infectés par le VIH in 2007 (comparé aux 23% de 2001) ; en Asie ce pourcentage était de 29% en 2007 (26% en 2001).(34)

Au niveau mondial, le nombre d'enfants vivant avec le VIH est passé de 1,5 million [1,3 million-1,9 million] en 2001 à 2,5 millions [2,2 millions-2,6 millions] en 2007. Le nombre estimé de nouvelles infections chez les enfants a toutefois diminué, passant de 460 000 [420 000-510 000] en 2001 à 420 000 [390 000- 470 000] en 2007. Les décès attribuables au sida parmi les enfants ont augmenté, de 330 000 [380 000 - 560 000] en 2001 à 360 000 [350 000-540 000] en 2005, mais commenceraient à diminuer, avec une estimation pour 2007 de 330 000 décès [310 000-380 000]. Près de 90% de l'ensemble des enfants séropositifs vivent en Afrique subsaharienne.(34)

La pandémie du VIH continue donc d'être un challenge majeur pour la santé mondiale.

II.2 Distribution géographique du VIH

La répartition géographique des différents VIH-1 diffère selon l'ancienneté dans le pays, et les migrations de population. Dans les pays du Nord, le sous-type B est prédominant et il est responsable de l'épidémie initial dans les pays industrialisés, en particulier l'Amérique du Nord et l'Europe de l'ouest. Par contre à l'échelle mondiale, les VIH-1 non-B représentent au moins 90% des virus circulants. Les sous-types prédominants sont les sous-types C, responsable de 50% des infections, principalement en Afrique du Sud et en Asie, le sous-type A et le sous-type D en Afrique de l'Est, le CRF02-AG en Afrique de l'Ouest et le sous-type B (12%) en Amérique du Nord et en Europe. En Afrique centrale, circulent les différents groupes du VIH-1 (M, N et O), l'ensemble des sous-types du groupe M et la majorité des formes recombinantes.

A la différence du VIH-1, un nombre limité de souches VIH-2 a été génétiquement caractérisé permettant une classification en 8 groupes (A-H), seul les groupes A et B jouent un rôle dans l'épidémie du VIH-2 en Afrique de l'Ouest. (24)

III. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFECTION A VIH

III.1 Modes de transmission du VIH

Depuis le début de l'épidémie, trois principaux modes de transmissions sont observés :

- Transmission sexuelle

A l'échelon mondial, la grande majorité des infections par le VIH ont été acquises à l'occasion de rapports sexuels non protégés, qu'ils soient hétérosexuels ou homosexuels. La transmission sexuelle de l'infection à VIH se fait par l'intermédiaire des muqueuses buccale, génitale ou rectale, lorsqu'elles sont en contact avec des sécrétions sexuelles ou du sang contenant du virus. La muqueuse présente une certaine perméabilité vis-à-vis du VIH, et on peut retrouver des cellules infectées (cellules dendritiques) dans la sous muqueuse après une exposition non traumatique de l'épithélium vaginale au VIH. La muqueuse rectale, par son épithélium monocellulaire, est la plus susceptible à l'infection (36).

- 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.(36)

- *Transmission verticale*

Dans les pays industrialisés, la transmission du virus de la mère à l'enfant peut survenir à différentes étapes de la grossesse : *in utero*, dans les semaines précédant l'accouchement, dans un tiers des cas, *intra-partum*, au moment de l'accouchement, dans deux tiers des cas. En Afrique sub-saharienne, il existe un risque supplémentaire lié à la pratique de l'allaitement maternel (risque d'infection pour l'enfant estimé entre 5 et 7 %). En ce qui concerne le VIH-2, le risque de transmission maternofoetale est beaucoup plus faible (de l'ordre de 1%) (36).

III.2 Réplication du VIH

Le VIH parasite le système immunitaire en utilisant à son propre compte diverses molécules de ce système. La sélectivité des tropismes du VIH et la sévérité du déficit immunitaire induit par l'infection sont en grande partie liées à l'interaction spécifique entre la glycoprotéine du VIH, la gp120 et la molécule CD4 récepteur de haute affinité au VIH. La molécule CD4 est une protéine membranaire exprimée en forte quantité à la surface des lymphocytes T auxiliaires. Le récepteur CD4 est également exprimé bien qu'à un moindre degré, sur les cellules présentatrices d'antigène : monocytes et macrophages, cellules dendritiques et de Langerhans, et sur la microglie dans le cerveau. Les cellules folliculaires dendritiques (FDC, *follicular dendritic cell*) fixent le VIH à leur surface mais ne sont pas infectées. Le VIH, par son tropisme pour le récepteur CD4, infecte ainsi les cellules centrales du système immunitaire et peut infiltrer la totalité des tissus humains (36).

La réplication du virus dans les cellules infectées se déroule en plusieurs étapes :

- *La fixation ou attachement*

Cette étape repose sur la reconnaissance entre les protéines de la surface virale (gp120) et les récepteurs CD4 de la cellule cible. En plus de la grande affinité gp120-CD4, des récepteurs accessoires sont nécessaires à la pénétration du virus dans la cellule. Ces récepteurs accessoires sont des chimiokines, et plus d'une dizaine de corécepteurs ont été identifiés, mais les principaux sont CXCR4 pour les lymphocytes T CD4⁺ et CCR5 pour les macrophages.

- *La fusion, la pénétration et la décapsidation*

C'est la seconde étape de l'infection intervenant juste après l'union de la gp120 avec son corécepteur. Cette union libère la protéine gp41 qui se fixe sur la membrane cytoplasmique. Par repli sur elle-même, la gp41 attire l'enveloppe virale vers la membrane cytoplasmique. La fusion des membranes cellulaire et virale a alors lieu grâce à un peptide de fusion présent

dans la gp41. La capside du VIH pénètre alors dans le cytoplasme de la cellule ; une fois à l'intérieur de la cellule, elle se désagrège, libérant les deux brins d'ARN et les enzymes qu'elle contenait.

Ainsi, la protéine gp120 est responsable de l'attachement et la gp41 de la fusion puis, de la pénétration au sein de la cellule.

- *La transcription inverse*

Cette étape est spécifique aux rétrovirus. Ces derniers ayant pour génome de l'ARN et non de l'ADN, une opération de transcription, "convertissant" l'ARN viral en ADN viral est nécessaire, car seul de l'ADN peut être intégré dans le génome de la cellule cible. Cette transcription est réalisée par l'enzyme appelée transcriptase inverse (TI). La TI parcourt l'ARN viral et le transcrit en une première molécule d'ADN simple-chaîne, ou ADN 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 PPT (poly purine tracts). 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. Une particularité de la transcriptase inverse est de ne pas être fidèle dans sa transcription et de souvent faire des erreurs. C'est une des raisons expliquant la très grande variabilité génétique du VIH.

- *L'intégration*

L'ADN bi caténaire pénètre dans le noyau cellulaire selon un processus actif encore mal compris. L'ADN bi caténaire est étroitement associé à l'intégrase et à d'autres composants protéiques viraux et cellulaires dans un complexe appelé complexe de pré-intégration. Ce complexe possède la capacité d'interagir avec des éléments de la membrane nucléaire pour traverser cette membrane et accéder à la chromatine cellulaire. L'ADN s'intègre ensuite au hasard dans le génome de la cellule cible sous l'effet de l'intégrase.

- *La formation d'un ARN 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 (messenger).

- *L'épissage*

L'ARNm ainsi obtenu est hétérogène. En effet, il est constitué d'une succession d'introns (parties non codantes) et d'exons (parties codantes). Cet ARNm doit subir une maturation

pour pouvoir être lu par les ribosomes. Se passe alors une excision des introns, pour ne laisser que les exons.

- *La traduction de l'ARN*

Une fois sorti du noyau par l'un des pores nucléaires, l'ARNm est lu par les ribosomes du RER (réticulum endoplasmique rugueux). L'ARNm vient se glisser entre les deux sous-unités du ribosome. 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 AUG (Adénine-Uracile-Guanine) fera débiter la synthèse des polypeptides.

- *La Maturation*

Elle a lieu dans l'appareil de Golgi : les polypeptides ainsi formés ne sont pas encore opérationnels. Ils doivent subir une maturation dans l'appareil de Golgi.

➤ *L'assemblage*

Les protéines de structure du virus (matrice, capsid et nucléocapsid) sont produites sous forme de polyprotéines. Lorsqu'elles sortent du Golgi, les différentes protéines sont liées entre elles. Les protéines sont transportées à la membrane où elles rejoignent les glycoprotéines virales membranaires. Des ARN viraux rejoignent les protéines virales. Les protéines de structure s'assemblent pour former la capsid et la matrice, englobant cet ensemble.

➤ *Le bourgeonnement*

La capsid sort de la cellule infectée en arrachant une partie de la membrane cellulaire (à laquelle ont été préalablement fixées les protéines virales de surface (gp120 et gp41).

➤ *La maturation des virus*

Une protéase virale doit couper les liens qui unissent les différentes protéines de structure (matrice, capsid et nucléocapsid) pour que les virions soient infectieux. Suite aux coupures, les virions sont prêts à infecter de nouvelles cellules.

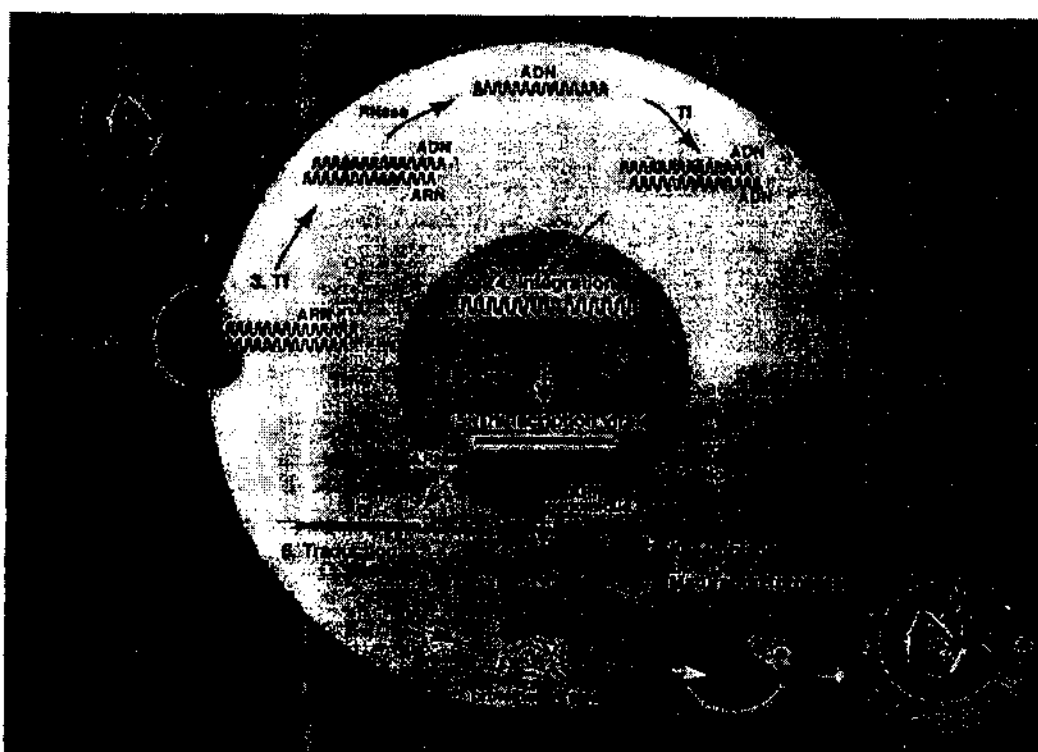


Figure 3 : Etapes de réplication du VIH dans une cellule (9)

III.3 Evolution physiologique de l'infection à VIH-1

D'un point de vue clinique, immunologique et virologique, l'infection par le VIH-1 peut être présentée en trois stades :

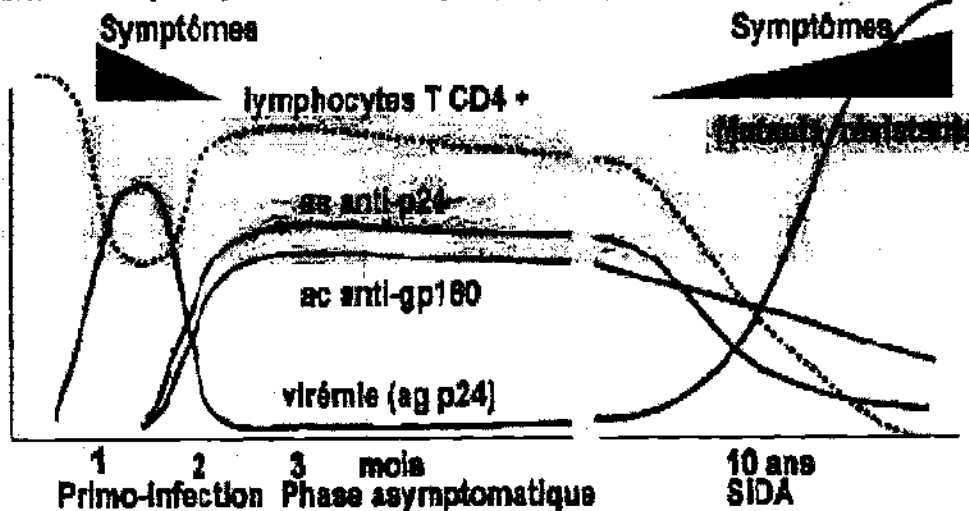
- **la primo-Infection (PI)** (phase initiale aigue) dure quelques semaines. Après contamination, le VIH-1 se multiplie silencieusement dans l'organisme pendant une dizaine de jours puis survient une virémie plasmatique contemporaine des éventuelles manifestations cliniques (fièvre, céphalées, dysphagie, asthénie, myalgie, amaigrissement, adénopathie) et précédant la séroconversion, c'est-à-dire l'apparition des anticorps (Ac). Au cours de la PI, la charge virale (CV) va atteindre un pic (ou « zénith »). Cette virémie massive comparable à celle des stades ultimes de la maladie, entraîne une large dissémination du VIH-1 dans les organes lymphoïdes et le tissu nerveux central. Ce niveau élevé de CV expose à un risque majeur de transmission sexuelle. Le pic de virémie est observé entre le 15^{ème} et le 21^{ème} jour après l'infection, pouvant atteindre plusieurs millions de copies/ml d'ARN VIH-1 plasmatique. Ce pic est suivi d'une phase de décroissance. Il

existe une grande variabilité inter-individuelle dans les taux de virémie plasmatique, certains sujets présentant d'emblée des virémies basses.

- **la période de latence clinique asymptomatique** dure plusieurs années. Durant cette période, il n'y a pas de latence virologique puis que la virémie plasmatique se stabilise environ 6 mois après la contamination autour d'une valeur plateau (ou « set-point » virologique) correspondant à l'équilibre *in vivo* entre production et clairance virale. Au cours de cette phase, la réplication du virus et sa clairance constituent un processus hautement dynamique au cours duquel les forts taux de production virale (entre 1 à 10 milliards de particules virales produites par jour) et d'infection des lymphocytes T CD4⁺ sont compensés par des taux aussi élevés de clairance virale, de mort des cellules infectées et de renouvellement des lymphocytes T CD4⁺, ce qui aboutit à des taux relativement stables de la virémie plasmatique.

- **la maladie SIDA** symptomatique dure quelques mois à plusieurs années en absence de traitement antirétroviral. Le SIDA est une immunodéficience acquise de l'immunité cellulaire résultant de l'infection par le VIH et caractérisée par une numération des lymphocytes T CD4⁺ inférieur à 200/mm³, une virémie exponentielle, une sensibilité accrue aux infections opportunistes et aux néoplasmes malins.

MULTIPLICATION DU VIH/HIV-1 DANS L'ORGANISME



A noter que la phase asymptomatique n'est pas une période de latence virologique : il y a multiplication virale et contagiosité, même sous traitement antirétroviral actif.

MARQUEURS VIRAUX AU COURS DE LA PRIMO-INFECTION PAR HIV-1,

SANS TRAITEMENT (Groupe de travail sur le diagnostic précoce, rapport au Directeur Général de la Santé, 1997)

Figure 4: Cinétique des marqueurs viraux au cours de l'infection à VIH-1 sans traitement

IV. QUANTIFICATION DU VIH-1 OU CHARGE VIRALE

IV.1 Définition

Stricto sensu, la mesure de la charge virale est la quantification d'un virus dans un compartiment de l'organisme. Pour le VIH-1 les marqueurs utilisés pour la quantification sont l'ARN viral et l'ADN proviral. Les compartiments explorés sont le plasma, le sang total, le lait maternel, les sécrétions vaginales, les cellules mononuclées du sang. Dans le plasma le marqueur utilisé pour la quantification de la charge virale sera l'ARN du fait de la présence des virus libres. Par contre, 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). La quantité d'ARN VIH-1 dans le plasma est directement corrélée avec le nombre de particules virales circulantes dans le plasma sanguin. Elle reflète essentiellement la multiplication active du virus dans l'organisme. La quantification de l'ADN proviral dans les cellules mononuclées sanguines a une signification plus ambiguë du fait de sa présence à la fois dans les cellules infectées quiescentes et dans les cellules produisant de grandes quantités de virus. Bien souvent, la quantification de l'ARN VIH-1 plasmatique est résumée par le terme « charge virale », il s'agit d'un terme impropre mais consacré par l'usage.

IV.2 Techniques de quantification du VIH-1

Il convient de préciser que seuls les tests moléculaires ayant fait l'objet d'évaluations poussées depuis de nombreuses années seront évoqués dans ce paragraphe. Depuis l'apparition de techniques d'amplification des acides nucléiques par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) au milieu des années 80, plusieurs « sauts » technologiques ont contribué à leurs succès (27). A présent, 3 techniques commerciales de détection et quantification de l'ARN VIH sont actuellement disponibles sur le marché, ce sont des techniques d'amplification de la cible.

- Reverse transcriptase (RT) PCR ; (Cobas Amplicor HIV-1 Monitor[®] Ultra Sensitive/Cobas Amplicor HIV-1 Monitor v1.5 ; Roche Diagnostics).
- Real-time PCR (Cobas TaqMan[®] HIV-1 Test; Roche Diagnostics / Abbott RealTime[®] HIV-1 ; Abbott Laboratories)
- Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA; NucliSensEasyQ[®] HIV-1 ; BioMérieux Clinical Diagnostics)

NB : Les techniques d'amplification du signal, Branched-chain DNA amplification (bDNA; Bayer Versant[®] HIV-RNA 3.0; Bayer Corp.) n'est plus commercialisé en 2010. Bayer

n'existe plus non plus et a fusionné avec Siemens. Siemens propose un nouveau test qui est une PCR en temps réel.

IV.2.1 Techniques d'amplification de la cible (ARN ou ADN proviral)

IV.2.1.1 Les tests de RT-PCR : Reverse Transcription Polymérase Chain Reaction

Elles exigent en première étape une transcription inverse (ou reverse transcription) convertissant la cible ARN VIH-1 en une matrice ADN simple brin (ADNc), laquelle est alors amplifiée en ADN double brin. La seconde étape d'amplification (polymérisation) comprend :

- Une dénaturation de l'ADN double brin (réalisée à environ 90°C),
- L'hybridation des amorces spécifiquement dans la séquence cible (température à 50-60°C)
- L'élongation de l'ADN double brin par polymérase à partir des dNTP (température à 70°C)

A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN double en cas d'efficacité optimale de la réaction de PCR. Le nombre de cycle d'amplification est de l'ordre de 30 à 40. (26)

Ces deux étapes (reverse transcription et polymérisation) sont réalisées au moyen d'une même polymérase recombinante thermostable.

La détection/quantification de la cible amplifiée est colorimétrique, et s'effectue comparativement à un standard quantitatif interne à la fin de la réaction d'amplification (détermination en point final).

Cette technologie est utilisée par Amplicor™ HIV-1 Monitor Test, version 1.5, Roche Diagnostic Systems, le gène cible est la région gag, le seuil de sensibilité de cette technique est de 400 copies/ml de plasma en procédure standard et 50 copies en protocole ultrasensible. Elle est applicable aussi bien sur du plasma, du PBMC que sur le sang total (DBS). Elle peut être manuelle sur microplaque coatée par des sondes VIH ou sur un automate (Cobas Amplicor).

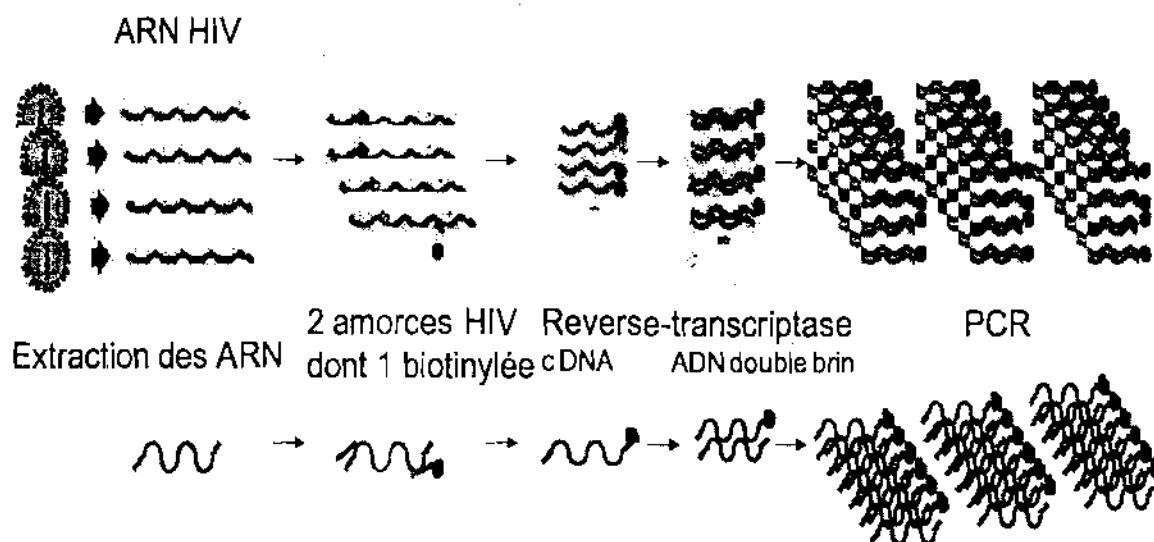


Figure 5: RT PCR par Amplicor HIV Monitor v1.5 Roche Diagnostic

IV.2.1.2 Les tests de RT-PCR en temps réel (real time PCR)

Le principe de la PCR en temps réel est basé sur celui de la RT PCR avec en plus la détection du signal d'amplification émise par une molécule de fluorescence spécifique à chaque cycle d'amplification (26). Les techniques cinétiques de PCR en temps réel vont réaliser simultanément l'amplification et la détection/quantification de la séquence cible lors de la phase exponentielle de l'amplification (14).

Classiquement, on distingue quatre phases majeures lors d'une amplification par PCR :

- La phase linéaire de base, qui correspond au début de la réaction de PCR, à cette étape l'émission de fluorescence correspond en fait au bruit de fond
- La phase exponentielle précoce, la quantité de fluorescence émise a atteint un seuil qui est significativement supérieur au bruit de fond (10 fois la déviation standard du bruit de fond).
- La phase linéaire d'amplification, la réaction de PCR se fait dans les conditions optimales avec approximativement un doublement des produits de PCR à chaque cycle.
- L'étape de plateau est atteinte quand les composants réactionnels de la PCR sont en quantité limitée. Il y a donc saturation de la réaction et l'intensité de fluorescence n'est alors pas utile pour l'acquisition des données.

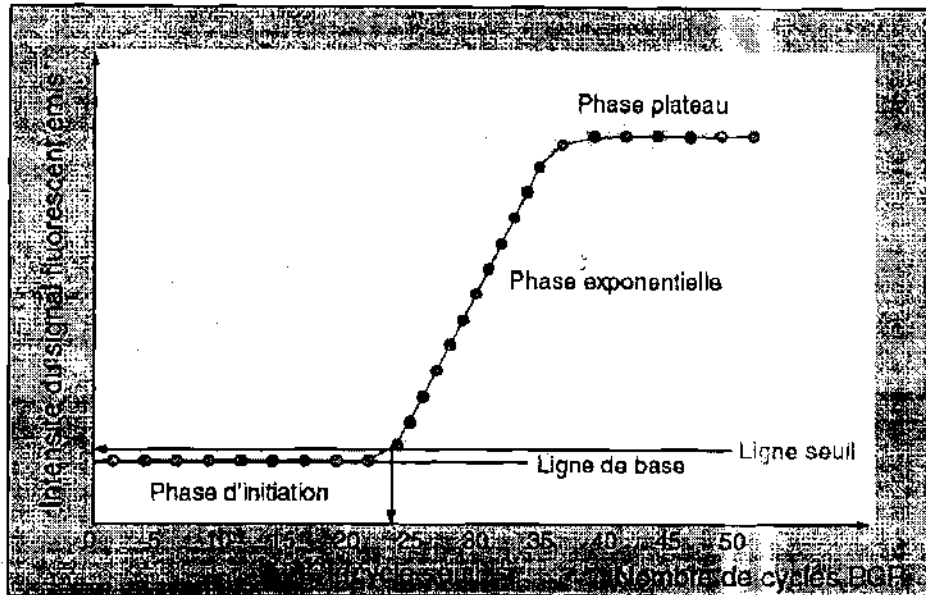


Figure 6: Différentes phases d'amplification d'une PCR en temps réel (4)

La RT-PCR en temps réel utilise différentes chimies pour la détection du signal d'amplification. Pour ce qui concerne ce paragraphe nous allons nous limiter aux sondes d'hydrolyses ou sonde TaqMan. Elles sont actuellement les plus utilisées dans les techniques de PCR en temps réel. La technologie Taqman est basée sur l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase pour hydrolyser une sonde hybridée à sa séquence cible sur l'amplicon durant l'étape d'hybridation/extension de la PCR. Un fluorochrome émetteur (reporter) (ex. FAM : 6-carboxyfluorocein mais aussi VIC, JOE, NED,) est fixé à l'extrémité 5' de la sonde d'hybridation et son émission est inhibée par un second fluorochrome suppresseur (quencher) présent à l'extrémité 3' (ex. TAMRA : 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine mais aussi DABCYL). Lorsque la sonde est non hybridée, le fluorochrome émetteur transfère son énergie au fluorochrome suppresseur voisin par le principe de FRET (fluorescence résonance énergie transfert) qui dissipe cette énergie sous forme de chaleur plutôt que d'émettre de la fluorescence. Étant donné que l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase est spécifique à l'ADN double brin, les sondes libres en solution demeurent intactes et aucune fluorescence n'est émise. Lors de l'étape d'hybridation, la sonde et les amorces se fixent à leurs séquences complémentaires respectives. A l'étape suivante, la Taq polymérase débute l'élongation du nouveau brin d'ADN à partir de l'amorce jusqu'à ce qu'elle rencontre sur son passage la sonde hybridée qu'elle déplace et hydrolyse avec son activité 5'-exonucléasique. Le reporter est alors libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de fluorescence qui augmente à chaque cycle proportionnellement au taux d'hydrolyse de la sonde. La technologie Taqman utilise une étape combinée d'hybridation et de polymérisation à 60-62°C

assurant l'hybridation et la stabilité de la sonde durant l'extension. Ceci permet aussi une activité 5'-exonucléasique maximale de la Taq polymérase (10).

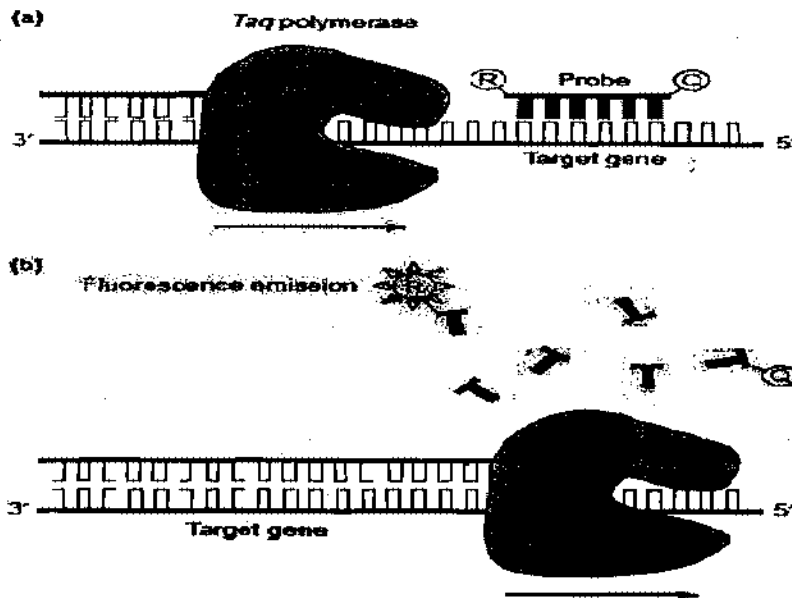


Figure 7: Principe de fonctionnement d'une sonde TaqMan (4)

Cette technologie de détection par les sondes TaqMan est utilisée par les constructeurs Roche, Abbott et par la technique ANRS.

Cobas TaqMan® HIV-1 Test; Roche Diagnostics et Abbott Real-Time™ HIV-1

Ces deux tests utilisent des automates complètement fermés réalisant l'extraction suivie d'une PCR en temps réel permettant la quantification de l'ARN VIH-1 plasmatique. Les procédés d'extraction sont basés sur le même principe. L'échantillon subit une première étape de lyse virale, suivie d'une fixation des acides nucléiques sur des billes magnétiques. La purification est assurée par une série de lavages au cours de laquelle les billes magnétiques sont capturées par un aimant. Finalement, les billes sont immergées dans un tampon permettant l'élution des acides nucléiques.

Le test Roche réalise la co-amplification de l'ARN cible du VIH-1 (région gag) et d'un ARN encapsidé (« armored RNA ») non infectieux utilisé comme standard interne compétitif de quantification. Ce standard interne contient des séquences du VIH avec des sites de liaison à la sonde qui permet de distinguer l'amplicon du standard et celui du VIH-1. Le standard interne est ajouté en quantité connue constante à chaque échantillon. Le mélange réactionnel contient donc les amorces et deux sondes, l'une spécifique de l'ARN VIH-1 et marquée par un fluorochrome, et l'autre spécifique de l'ARN du standard interne du VIH-1 et marquée par un autre fluorochrome. Cela permet leur identification indépendante.

Le test Abbott utilise dans le tampon de lyse un contrôle interne non compétitif de façon à vérifier si toutes les étapes de l'extraction à l'amplification se sont bien déroulées. Le contrôle interne correspond à de l'ARN encapsidé dérivé du gène de l'hydroxypyruvate

réductase provenant de la citrouille (*curcubita pepo*). Ce test est ciblé dans la région *pol-in* du VIH-1. Il utilise une sonde partiellement double brin, longue de 43 pb, ce qui autorise les mis-appariements. Une gamme d'étalonnage externe à 3 points en duplicate est employée pour la quantification à chaque changement de lot de réactif. Les virus de groupe O sont quantifiables par cette technique.

Le test Versant kPCR Moléculaire System : cette technique utilise deux modules dont un système de préparation des échantillons qui réalise l'extraction et la purification des acides nucléiques du plasma et un système amplification/détection par PCR en temps réel. Un contrôle interne non compétitif permet de contrôler les différentes d'extraction purification amplification/détection. Le système détecte les VIH-1 du groupe M (A à H), CRF-AE, CRF-AG et le groupe O. La région du génome concerné est *pol intégrase*

Le test de l'ANRS : il s'agit d'une technique mise au point par l'ANRS qui réalise une extraction manuelle avec le kit Qiagen. C'est une technique de purification de l'ARN par centrifugation sur colonne. La quantification/détection est réalisé au moyen du kit Generic HIV-1 commercialisé par Biocentric. La région du génome viral concerné est le *LTR*, une gamme d'étalonnage en six points obtenus par une dilution en cascade de raison 10 est utilisée pour la quantification. Un contrôle externe (témoin de reproductibilité) de concentration connue assure le contrôle depuis l'extraction jusqu'à l'amplification. Ce test est uniquement destiné à la recherche.

IV.2.1.3 La technologie NASBA

La technologie NASBA permet l'amplification de la cible ARN (gène *gag* de l'ARN VIH-1). Elle est basée sur une succession d'étape de transcription et d'élongation à l'aide de trois enzymes (transcriptase inverse du virus aviaire myéloblastique, polymérase ARN T7 et RNase H) et deux amorces. C'est une réaction isotherme, la température d'amplification est de 41°C. (16)

Le processus d'amplification dans la technique NASBA suit une cinétique exponentielle. Ce test nécessite la co-extraction et la co-amplification de la séquence cible avec des quantités connues de trois standards (ou calibrateur). L'addition d'un calibrateur à chaque échantillon dès la phase d'extraction va permettre la quantification des ARN dans des conditions standardisées.

La détection en temps réel se fait à l'aide de balises moléculaires et est basée sur la mesure de l'augmentation d'un signal fluorescent. Ce signal apparaît uniquement lors d'une hybridation spécifique d'une balise moléculaire à un amplicon, et permet la détection de ces amplicons en phase homogène de façon rapide et fiable.

Une balise moléculaire est un oligonucléotide d'ADN ayant la forme d'une épingle à cheveux (hairpin en anglais). Ces balises sont constituées de deux (2) parties : une partie en

boucle correspondant à la séquence complémentaire de la cible que l'on veut mesurer, et une partie linéaire constituée de deux séquences complémentaires et permettant de refermer la boucle sur elle même. A l'extrémité de cette partie linéaire, on trouve un fluorophore (émetteur de fluorescence : FAM, TAMRA, TET, ROX) et un quencher (extincteur de fluorescence : DABCYL). La présence de cet extincteur au voisinage du fluorophore permet d'occulter la production de fluorescence lorsque la balise est dans sa forme de base. En présence d'une séquence «cible» la balise s'ouvre, le fluorophore se trouve alors éloigné de l'extincteur et émet un signal fluorescent.

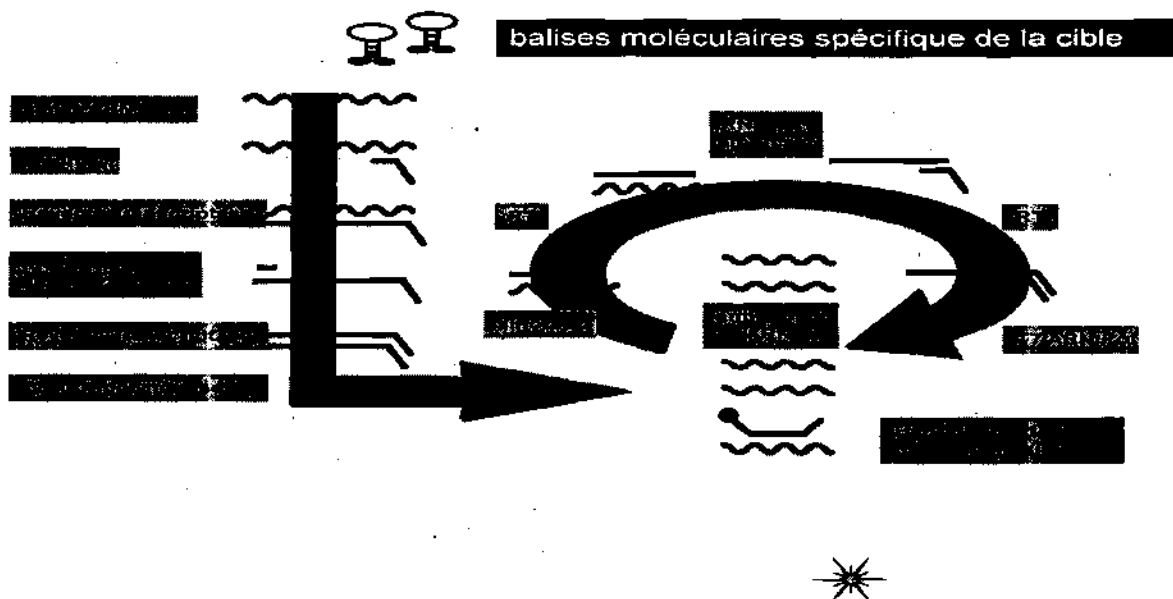


Figure 8: Etapes d'amplification dans la technique NASBA (29)

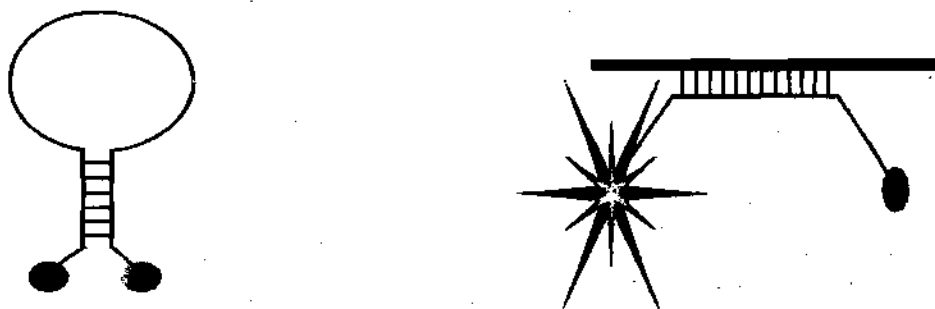


Figure 9: Principe de fonctionnement d'une balise moléculaire (29)

Le test NucliSens EasyQ v1.2: il utilise la technologie NASBA et réalise une extraction automatisé (EasyMag) ou semi automatique (MiniMag) des acides nucléiques (ADN et ARN) par emploi de billes de silice. L'étape d'amplification /quantification est aussi réalisé au moyen d'un automate fermé. La quantification de l'ARN du VIH-1 (région gag) est

comparée à celle obtenu avec le standard interne. Le test permet de mesurer la charge virale dans le sang total (DBS), plasma, sérum etc....

Tableau 1: Tests commerciaux utilisés pour la quantification de l'ARN VIH-1 (26)

test	échantillon	Vol (µl)	sensibilité	intervalle	Sous-type VIH-1 détecté	Niveau d'automatisation
RT PCR						
Cobas Amplicor HIV-1 v1.5	EDTA plasma	200	400	750000	Groupe (tous les ss-types)	M Extraction manuel
Cobas Amplicor HIV-1 ultra sensible	EDTA plasma	500	50	50-75000	Groupe (tous les SS-types)	M Extraction manuel ou automatique
PCR en temps réel						
Cobas TaqMan® HIV-1 test	EDTA plasma	1000	40	40-10000000	Groupe (SS-types H)	M Extraction automatique
Abbott RealTime® HIV-1	ACD et EDTA plasma	1000 500 200	40 75 150	40-10000 000	Groupe (SS-types H) Groupe N	M Extraction manuel ou automatique
Amplification des acides nucléiques						
NucliSens EasyQ® HIV-1	EDTA plasma	1000 2000 50	50	50-3000000	Groupe (SS-types A-J)	M Extraction semi automatique ou automatique

V. PAPIERS FILTRE (DBS) DANS LE DIAGNOSTIC ET LE SUIVI DE L'INFECTION A VIH

Le terme « dried blood spot » ou DBS signifie goutte de sang séchée. Depuis les années 1960, les papiers filtres ont été utilisés pour l'étude de plusieurs pathologies chez les nourrissons. C'est un mode de collecte de sang sur du papier buvard à des fins d'analyses sérologiques ou moléculaires. Des échantillons de sang sont collectés, séchés, transportés pour être analysés et archivés. L'adoption de cette procédure a été suggérée car elle est facile, souple et moins coûteuse pour la mise en œuvre des programmes d'étude du VIH dans les pays à ressource limitées. Elle trouve son application dans les études de

séroprévalence, de détermination de la transmission mère enfant du VIH, la détermination de la charge virale, des tests de génotypage et de résistance aux antirétroviraux (2).(41)

Dans le cadre du diagnostic précoce des enfants exposés au VIH, et du suivi virologique des patients sous ARV, de nombreux tests ont été adaptés aux DBS en vue d'optimiser la prise en charge des patients. Ce sont :

- Test Roche Amplicor
- Test NucliSens BioMérieux
- Test RealTime PCR Abbott

V.1 Prélèvement sur papier filtre

Le prélèvement sur papier filtre ou papier buvard nécessite du matériel adapté et des conditions particulières. Les sites de prélèvement chez les enfants de 18 mois et moins sont le gros orteil, le talon et le bout des doigts. Chez l'adulte le prélèvement se fait sur le bout des doigts.

Le matériel requis se compose de :

- Papier buvard
- Lancette stérile
- Désinfectant pour prélèvement
- Ouates/tampons alcoolisés
- Sac plastique avec possibilité de le sceller
- Dessicant
- Indicateur d'humidité si possible

La procédure consiste à :

- Réchauffer la partie choisie (talon ou gros orteil)
- Désinfecter la partie avec de l'alcool et laisser sécher 30 secondes
- Piquer franchement la partie choisie avec une lancette
- Essuyer la première goutte avec une ouate non imbibé d'alcool
- Déposer la seconde goutte formée sur le cercle de la carte et le remplir entièrement
- Remplir les autres cercles.

Les DBS doivent être confectionnés dans les conditions de biosécurité universelle, et étiquetés avec le numéro d'identification du patient.

V.2 Stockage, transport, et conservation des DBS

Les DBS confectionnés sont séchés à température ambiante pendant 3 à 18 heures à l'abri de la lumière solaire, de la poussière et des insectes. Il faut éviter de toucher les spots de sang ou de les entasser pendant le processus de séchage.

Après séchage chaque échantillon DBS est emballé dans du papier weight (intercalaire) pour éviter les contaminations inter échantillons, puis les DBS (10) sont stockés dans des sacs plastiques qui sont scellés et qui contiennent des dessicants (2 à 4) et un indicateur d'humidité. Ils peuvent être conservés au réfrigérateur (+2 à +8°C) pendant 8 jours avant d'être acheminés au laboratoire de référence pour analyse. Pendant le transport les DBS ne doivent pas être exposés au soleil.

**DEUXIEME PARTIE :
NOTRE ETUDE**

I. OBJECTIFS

Objectif général

Evaluer l'intérêt du papier filtre dans la quantification de l'ARN VIH-1 chez des personnes infectées et sous traitements ARVs.

Objectifs spécifiques

1. Calculer le **seuil de sensibilité** (limite de détection) de la technique.
2. Déterminer la **répétabilité intra-essai** (précision à court terme) de la technique.
3. Déterminer la **reproductibilité inter-essai** (précision à long terme) de la technique.
4. Calculer les **corrélations et concordances** des résultats de charge virale de l'ARN VIH-1 obtenus à partir des DBS, comparativement aux valeurs obtenues dans le plasma.
5. Déterminer les **sensibilités et spécificité cliniques** de la technique pour réaliser le diagnostic pédiatrique précoce de l'infection à VIH-1, comparativement à l'emploi d'échantillons de plasma.
6. Comparer les **cinétiques** de l'ARN VIH-1 par emploi des DBS, comparativement à celles obtenues avec le plasma, pour réaliser le suivi thérapeutique des patientes traitées par ARVs.

II. METHODOLOGIE

1. Type de l'étude

Il s'agit d'une étude analytique et clinique rétrospective utilisant la biothèque DBS stockée entre 2005 et 2008 à -20°C dans le cadre de l'essai Kesho-Bora.

2. Cadre de l'étude

Notre étude a pour cadre le Laboratoire de Virologie du Centre Muraz à Bobo-Dioulasso (Burkina Faso). Ce laboratoire a pour vocation le diagnostic biologique des infections virales (VIH, Hépatite, Fièvre Jaune) dans le cadre d'activités de recherche ou de routine (patients externes).

Pour la quantification de l'ARN VIH-1 plasmatique, ce laboratoire participe à des programmes d'assurance qualité internationaux (notamment celui organisé par l'ANRS, Paris, France).

Il réalise aussi la formation de jeunes chercheurs à orientation virologique.

3. Population d'étude

La population d'étude est issue de l'essai multicentrique (Burkina Faso, Kenya, Afrique du Sud) OMS/ANRS 1289 Kesho-Bora de Prévention de la Transmission Mère Enfant (PTME) du VIH-1.

Pour la ville de Bobo-Dioulasso, entre Mai 2005 et Décembre 2007, 350 mères infectées par le VIH-1 ont été recrutées dans cet essai. En fonction de leurs taux de CD4 à l'inclusion, ces mères ont reçu les schémas thérapeutiques suivants :

- Partie Ia : CD4 < 200/mm³ (cohorte observationnelle)

Les mères ont reçu un traitement ARV associant la prise de ZDV+3TC+NVP.

- Partie Ib : CD4 > 500/mm³ (cohorte observationnelle)

Les mères ont reçu une prophylaxie ARV associant une prise courte en pré-partum de ZDV et de NVP simple dose lors du travail.

- Partie II : CD4 compris entre 200 et 500/mm³ (essai Kesho Bora)

Les mères ont reçu une prophylaxie ARV associant (i) une prise courte en pré-partum de ZDV plus de NVP simple dose lors du travail plus de la ZDV ± 3TC pendant une semaine après l'accouchement ; (ii) ou une prise longue de ZDV+3TC+LP/r pendant une période maximale de 6 mois après l'accouchement.

Les nouveau-nés correspondants ont été suivis jusqu'à 24 mois de vie. Ils ont tous reçus une simple dose de NVP administré entre 0-3 jours de vie et parfois associée à la

prise de ZDV pendant une semaine après la naissance. L'ensemble des nouveaux nés a fait l'objet d'un diagnostic pédiatrique précoce en testant en prospectif pour l'ARN VIH-1 les plasmas prélevés à 6 semaines de vie. En cas de négativité, la recherche de l'ARN VIH-1 a été répétée à 12 mois de vie (en raison du risque de transmission du VIH-1 par l'allaitement maternel).

Cet essai a été accepté par les différents comités d'éthique nationaux et internationaux.

4. Méthodologie

4.1 Prélèvements/Visites

4.1.1. Mères infectées par le VIH-1

Le tableau 2 résume les prélèvements de plasma et DBS réalisés chez les mères incluses dans l'essai Kesho-Bora. À partir de sang veineux prélevé sur tube EDTA à chaque visite, des aliquots de plasmas (aliquots de 2.0 ml, stockage à -80°C) ainsi que des DBS (4 à 5 spots de 50 µl, stockage à -20°C) ont été réalisés.

Tableau 2: Prélèvement de plasma et de DBS réalisés chez les mères incluses dans l'essai Kesho Bora, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso (2005-2008)

Visite	Nomenclature	Plasma	DBS*	
			05/05-04/07	A partir de 05/07
Inclusion	M01	X	X	X
Après 1 semaine d'ARV	M02	X	X	
Après 3 semaines d'ARV	M03	X	X	
Accouchement	M04	X	X	
Semaine 2	M05	X	X	
Semaine 6	M06	X	X	
Mois 3	M07	X	X	
Mois 5	M08	X	X	X
Mois 6	M09	X	X	
Mois 9	M10	X	X	
Mois 12	M11	X	X	
Mois 18	M12	X	X	
Mois 24	M13	X		

*DBS=Un papier filtre avec 4 spots chacun.

Pour la présente étude, nous avons testés en DBS :

- 91 mères prélevées à la visite M01 (avant instauration de toute prise d'ARV),
- 13 mères traitées par ARVs (partie Ia) et prélevées aux visites M01, M04, M09 et M11.

4.1.2. Enfants exposés au VIH-1

Le tableau 3 résume les prélèvements de plasma et DBS réalisés chez les enfants nés de mères séropositives incluses dans l'essai Kesho Bora. À partir de sang veineux prélevé sur tube EDTA à chaque visite, des aliquots de plasma (stockage à -80°C) ainsi que des DBS (stockage à -20°C) ont été réalisés.

Tableau 3 : Prélèvements de plasma et de DBS réalisés chez les enfants nés de mères incluses dans l'essai Kesho-Bora, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso (2005-2008).

Visite	Nomenclature	Plasma	DBS
0-7 jours de vie	C04	X	X
Semaine 2	C05		X
Semaine 6	C06	X	X
Mois 3	C07	X	X
Mois 5	C08		
Mois 6	C09	X	X
Mois 9	C10	X	X
Mois 12	C11	X	X
Mois 18	C12	X	X
Mois 24	C13	X	X

Pour la présente étude, nous avons testés en DBS :

- un certain nombre de DBS chez des enfants testés négatifs en ARN VIH-1 plasmatique aux visites C06, C07, C09 ;
- tous les DBS disponibles pour lesquels les plasmas correspondant avaient été trouvés positifs en ARN VIH-1 plasmatique.

4.2. Techniques de quantification de l'ARN VIH-1

La technique évaluée dans ce travail est la suivante :

- Extraction : Utilisation de DBS pour réaliser l'extraction de l'ARN VIH-1 au moyen du kit NucliSens (BioMérieux, France) ;
- Amplification/quantification : Emploi de la trousse Genieo (Biocentric, Bandol, France)

La technique de référence (ou gold standard) ayant servi aux comparaisons est la suivante :

- Extraction : Utilisation de plasma pour réaliser l'extraction de l'ARN VIH-1 au moyen du kit QIAmp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France)
- Amplification/quantification : Idem (emploi de la trousse Genieo (Biocentric, Bandol, France))

4.2.1 Nature des échantillons

a. papiers filtres (DBS) :

A partir des échantillons de sang veineux prélevés chez les enfants, deux spots de 50µl chacun de sang total sont déposés sur du papier filtre (Whatman 903, Inc Sanford, ME.US 58X58 cm, réf 10538018). Les papiers filtres sont séchés à température ambiante pendant 18 à 24 heures avant d'être scellés dans des sachets en plastique, stockés et conservés à -20°C dans des boîtes contenant du gel de silice.

Pour la quantification de l'ARN VIH-1, deux spots de 50 µl chacun sont utilisés.

b. plasma :

A partir des échantillons de sang total, des aliquots de 2 ml de sang total sont prélevés, centrifugés et sont stockés à -80°C.

4.2.2. Extraction de l'ARN VIH-1

a. Papiers filtres de sang total (DBS)

Le protocole d'extraction de Biomérieux sur le NucliSens Mini Magnétique est utilisé pour la quantification de l'ARN VIH-1. Il s'agit du kit NucliSens Magnétique (BioMérieux, Boreind, Netherland). L'extraction des acides nucléiques au moyen du kit NucliSens repose sur la chimie de Boom en utilisant des particules magnétiques. Deux confettis de 50µl de DBS sont découpés et placés dans les tubes de 2.0 ml (NucliSens lysis buffer), les tubes sont ensuite placés sur le « mixer-roller » (agitateur rotatif) et laissés en incubation pendant une heure à température ambiante. Après l'incubation, les confettis étant en contact avec le tampon de lyse, il s'ensuit une l

cellulaires et la libération des acides nucléiques (ARN et ADN proviral VIH-1). Le lysat est transféré dans des microtubes de 2.0 ml ; puis 50µl de silice est ajoutée en prenant soin de bien vortexer avant chaque ajout. Dans les conditions de salinité élevée, après 10 mn d'incubation, les acides nucléiques vont se fixer sur les particules de silice qui agissent comme une phase solide. Par emploi du NucliSens MiniMag, plusieurs étapes de lavage sont effectuées : deux lavages de 30 secondes avec 400µl de WashBuf 1, deux lavages de 30 secondes avec 500µl de WashBuf 2 et un lavage de 15 secondes avec 500µl de WashBuf 3. Les composants étrangers aux acides nucléiques sont retirés grâce à la pompe à vide. Les acides nucléiques sont ensuite élués de la phase solide avec 25µl de la solution d'éluion et conservés à -20°C.

Le matériel nécessaire à l'extraction est le suivant :

- Instrument d'extraction magnétique capable de capter les billes de silice et de les mixer en solution (MiniMag)
- Agitateur thermostaté (thermomixer compact. Eppendorf) : T^c limite de 80°C ; fréquence d'agitation de 1200 à 1400t /min
- Portoir magnétique adapté aux microtubes de 1,5 ml
- Portoirs
- Microtubes de 2 ml, 1,5 ml
- Centrifugeur de 1500 rpm
- Micro centrifugeur
- Sample mixer-roller (agitateur rotatif)
- Micropipettes calibrées avec graduation de 5 à 1000µl
- Embouts de pipettes stériles (pipettes tips de 20µl, 100µl et 1000µl)
- Mélangeur à vortex
- Chronomètre
- Papier absorbant
- Gants sans talc jetables
- Conteneur de déchet à couvercle

b. Plasma

Le kit QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) a été utilisé pour l'extraction de l'ARN VIH-1 plasmatique. Ce kit utilise la propriété de la fixation sélective de l'ARN VIH-1 sur les membranes de gel de silice (38). Après lyse virale par 800µl du mélange réactionnel (ARN entraîneur, tampon AVE, tampon AVL) pendant 10 minutes, 800µl d'éthanol absolu est ajouté afin de précipiter les acides nucléiques. Les lysats sont transférés dans les colonnes contenant la membrane de gel de silice et centrifugés à 8000

rpm pendant une minute. Une série de lavage permet d'éliminer les protéines précipitées et les impuretés. L'ARN VIH-1 est récupéré par 60µl de la solution d'éluion après centrifugation à 8000 rpm pendant une minute et conservé à -20°C.

4.2.3. Papiers filtres des mères traités par ARV

Les DBS de 13 mères sous traitement ARV (Partie Ia : CD4 < 200/mm³, les mères ayant un traitement ARV associant la prise de ZDV+3TC+NVP ARV) ont été traités de deux manières :

- Amplification direct des extraits DBS suivant le protocole décrit
- Amplification des extraits DBS préalablement traités par la DNase (DNase I, Applied Biosystems/Ambion Inc., Austin, TX, USA). Suivant le protocole ci-dessous:

15µl d'extrait obtenu par extraction sur MiniMag + 1,5µl d'EDTA 50 mM incuber à 95°C pendant 10 mn. Ajouter 1,5 µl de Buffer 10X et 3,0 µl de DNase (2U)

Incuber dans le thermocycleur 37°C 60 mn puis 70°C 10mn

Ces papiers filtre sont traités avec la DNase car la technique d'extraction NucliSens n'est pas spécifique de l'ARN mais fait une extraction d'acides nucléiques totaux (ARN+ADN).

4.2.4. Amplification et quantification de l'ARN VIH-1

Quel que soit la nature de l'échantillon utilisé (DBS ou plasma), l'amplification/quantification de l'ARN VIH-1 sera réalisée par emploi du kit Generic HIV charge virale mis au point par l'ANRS et distribué par la société Biocentric (Bandol, France). Ce test de PCR en temps réel a pour séquence cible une région consensus située dans le gène LTR (pour Long Terminal Repeat). Il utilise une sonde d'hydrolyse de type TaqMan. Il permet la quantification de la plupart des sous type du groupe M (A à G) et CRFs du VIH-1 (38).

Ce kit, prêt à l'emploi, comprend :

- Mix SuperSript™ III RT / Platinum® Taq,
- Réaction Mix 2X,
- Amorces A,
- Amorces B,
- Sonde C,
- Un standard de quantification de titre variable en fonction des lots (en général, 10.000.000 UI/ml),

- un standard de reproductibilité qui sert de contrôle faiblement positif (en général, présentant un taux d'ARN VIH-1 assez bas, autour de 10.000 UI/ml).

a. *Le programme d'amplification :*

- 48°C pendant 30 minutes permettant la reverse transcription de l'ARN viral en ADN complémentaire double brin,
- 95°C pendant 10 minutes permettant l'activation de l'enzyme Taq Polymérase dite « hot start »,
- Puis 50 cycles de PCR selon le programme de thermocyclage suivant :
- 95°C pendant 15 secondes permettant la dénaturation des 2 brins d'ADN par rupture des liaisons hydrogène,
- 60°C pendant 1 minute permettant l'hybridation des amorces sens et antisens puis de la sonde sur chacun des simples brins d'ADN ainsi que la polymérisation

b. *Préparation des standards*

Chaque plaque de quantification comprendra en plus des échantillons cliniques,

- Une gamme de standard de charge virale préparée à partir du standard fourni par le kit (10^7 UI/mL équivalent à $6.2 \cdot 10^5$ copies/mL) : les standards sont obtenus par le même procédé d'extraction que les échantillons plasma et DBS. Pour le standard DBS, une dilution préalable 1 :1 du standard avec du sang séronégatif est incubé pendant une heure puis des spots de 50µl sont déposées sur du papier filtre. Une série de dilution en cascade selon une raison géométrique de 10 dans de l'eau qualité Biologie Moléculaire (10µl d'Eluât + 90µl H₂O) permet d'obtenir les cinq points de la gamme du standard plasma ($6.2 \cdot 10^5$; $6.2 \cdot 10^4$; $6.2 \cdot 10^3$; $6.2 \cdot 10^2$ copies/ml) et DBS ($3.1 \cdot 10^5$; $3.1 \cdot 10^4$; $3.1 \cdot 10^3$; $3.1 \cdot 10^2$ copies/ml)
- un témoin de reproductibilité (contrôle faiblement positif) de charge virale VIH obtenu par le même procédé d'extraction que les échantillons plasma (10^4 UI/ml ou $6.2 \cdot 10^3$ copies/ml) et DBS (3100 copies/ml) après dilution 1 : 1 avec du sang séronégatif.
- un témoin négatif (NTC, correspondant à de l'eau qualité biologique).

5. *Traitement et analyse des données*

Les données ont été analysées par emploi du logiciel Excel 2007.

- Les résultats de CV ARN VIH-1 obtenus à partir des DBS ont été corrigés par l'hématocrite, selon la formule suivante : $CV\ DBS \times 100 / (100 - Ht)$.
- Le seuil de la technique : C'est la plus petite valeur de la gamme pouvant être quantifiée, avec une incertitude acceptable. Quatre points ($3.10 \cdot 10^3$; $1.55 \cdot 10^2$; 7.75

10^2 ; $3.10 \cdot 10^2$ copies/ml) de dilution de 10 gammes ont été mesurés sur un même run.

- la sensibilité et la spécificité a été calculée par rapport aux valeurs de la charge virale plasmatique qui est le gold standard.
- la reproductibilité (précision inter essai) a été calculée à partir des valeurs des contrôles faiblement positifs sur plus de 10 runs indépendants.
- la répétabilité (précision intra essai) a été calculée à partir des valeurs de 10 contrôles faiblement positifs (3100 cp/ml) sur un même run.
- la corrélation de la charge virale plasma vs DBS a été déterminée les valeurs des charges virales de même que les Bland d'Altman.

6. Les variables de l'étude

L'évaluation de la technique a été faite avec les variables suivantes :

6.1 Performance analytique des DBS

- les valeurs de la gamme et du témoin de reproductibilité
- les dates de confection des DBS et les dates d'amplification virale

6.2 Evaluation clinique par les DBS

- les valeurs de la charge virale des DBS
- les valeurs de la charge virale plasmatique
- le taux d'hématocrite

RESULTATS

I. PERFORMANCES ANALYTIQUES DES DBS

I.1 Limite de détection de la technique appliquée au DBS

Les points de dilution de la gamme de $3,10 \cdot 10^6$ à $3,10 \cdot 10^2$ ont été amplifiés à 100%. Le point 310 a donné des résultats dans 10/21 run soit 48% de détection. De ce fait deux dilutions de raison $\frac{1}{2}$ à partir du point 3100 (1550 ; 775) ont été nécessaires pour déterminer avec plus de précision la limite de détection.

Tableau 4: seuil de sensibilité de la technique appliquée aux DBS

Concentrations	Nombre de test	Nombre de détection	% Détection
31,000	11	11	100
3,100	21	21	100
1,550	10	10	100
775	10	7	70
310	21	10	48

La limite (seuil de sensibilité) a donc été défini à 1550 copies/ml ($3,17 \log_{10}$) de sang total, par emploi de 2 spots de sang de 50 μ l chacun.

I.2 Répétabilité intra-essai

Les valeurs de 10 DBS de contrôle faiblement positifs (*valeur estimé à $3,5 \log_{10}/ml$*) extrait le même jour dans les mêmes conditions et analysés sur un même run ont permis d'obtenir une moyenne de $3,65$ (SD, $\pm 0,23$) \log_{10}/ml et un coefficient de variation de 6,3%.

I.3 Reproductibilité inter-essai

Les valeurs de DBS de contrôle faiblement positifs (*valeur estimé à $3,5 \log_{10}/ml$*) extraits indépendamment et analysés sur des runs différents donnent une moyenne de $3,32$ (SD, $\pm 0,30$) \log_{10}/ml et un coefficient de variation de 9,03%.

1.4 Impact de la durée de conservation des DBS sur la fiabilité des résultats obtenu par les DBS

Avant la réalisation des tests de quantification de la charge virale, les DBS ont été stockés à -20°C pendant une période médiane de 669 jours [2-1318 jours]. Les DBS stockés à court ou moyen terme (≤ 669 jours) ou à long terme (> 669 jours) ont des coefficients de corrélations de 0,97 ($P < 0,01$) et 0,99 ($P < 0,002$) comparativement aux valeurs plasmatiques. Le temps de conservation à -20°C n'a donc pas d'effet statistiquement significatif sur les charges virales DBS.

II. EVALUATION CLINIQUE DES DBS

II.1 Diagnostic précoce des enfants exposés au VIH :

Un total de 210 DBS a été collecté chez des enfants nés de mères séropositives à différents timing de visite. La charge virale plasmatique était le gold standard des résultats DBS. Sur 105 échantillons plasmatiques positifs (ARN VIH-1 détectable), les DBS appariés (105) sont également détectables en ARN VIH-1, soit 100% (105/105) de détectabilité. 105 DBS ont été trouvés négatifs (ARN VIH-1 indétectable) de façon concordante avec les résultats plasmatiques.

Tableau 5 : Répartition des enfants exposés par tranche d'âge

Age	ARN VIH-1 détectable n/N (%)	ARN VIH-1 indétectable n/N (%)
0 – 6 semaines	22/22 (100,0)	94/94 (100,0)
3 – 6 mois	33/33 (100,0)	4/4 (100,0)
9 - 18 mois	50/50 (100,0)	7/7 (100,0)
Total	105/105 (100,0)	105/105 (100,0)

II.2 Corrélation et concordance des charges virale ARN VIH-1 plasmatique et DBS chez les enfants infectés

La moyenne des charges virales obtenues avec les plasmas et les DBS est de 5,68 \log_{10} cp/ml et 6,02 \log_{10} cp/ml respectivement, avec une moyenne des différences de 0,17 (SD, 0,42) le test de différence est très significatif avec $P < 0,001$. Le coefficient de corrélation (R^2) est de 0,89 ($P < 0,001$).

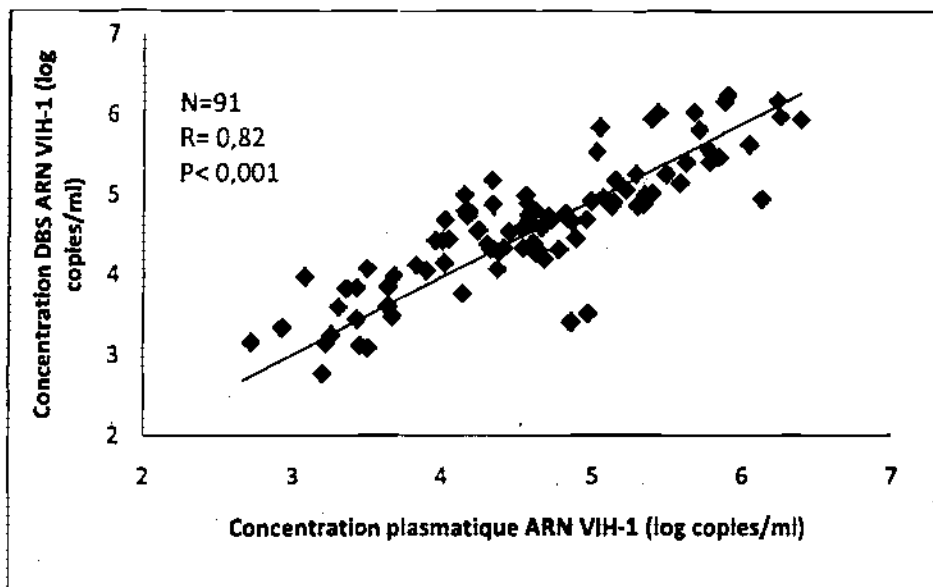


Figure 10 : Corrélation des charges virale ARN VIH-1 plasmatique et DBS chez les enfants infectés par le VIH-1

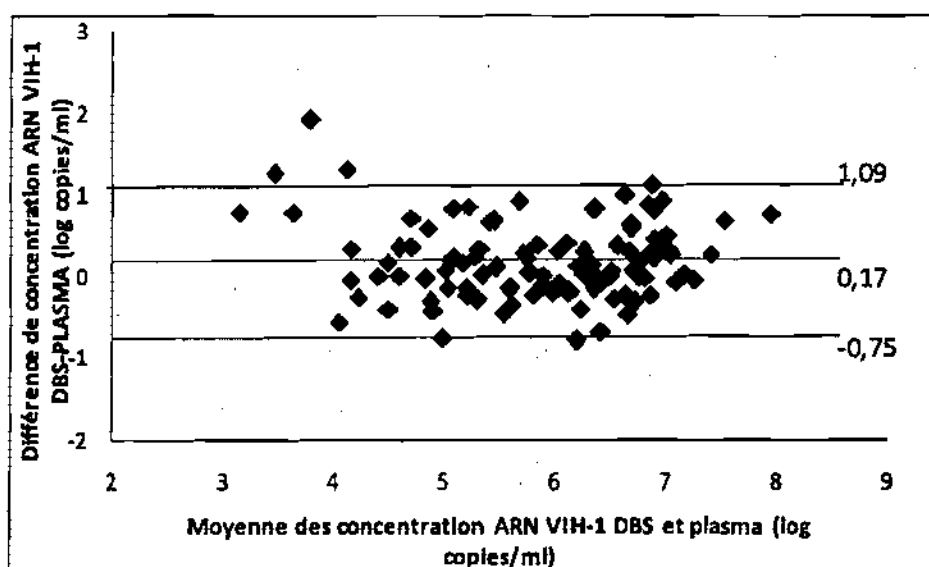


Figure 11: Bland-Altman, différence entre les concentrations d'ARN VIH-1 plasma et DBS chez les enfants infectés

11.3 Corrélation et concordance des charges virales plasmatiques et DBS chez les mères séropositives

Les mesures de charge virale sur DBS de 91 mères séropositives ont été comparées à celles obtenues sur les prélèvements plasmatiques correspondants. Les moyennes des charges virales sont de 4,57 et 4,54 Log₁₀ cp/ml respectivement pour le plasma et les DBS. Deux échantillons DBS avaient une charge virale indétectable toute fois les charges virales plasmatiques étaient très faibles pour ces deux échantillons. La sensibilité est de 97,8% IC 95% [92,29 – 99,73] soit 89/91 avec une corrélation (R²) de 0,82.

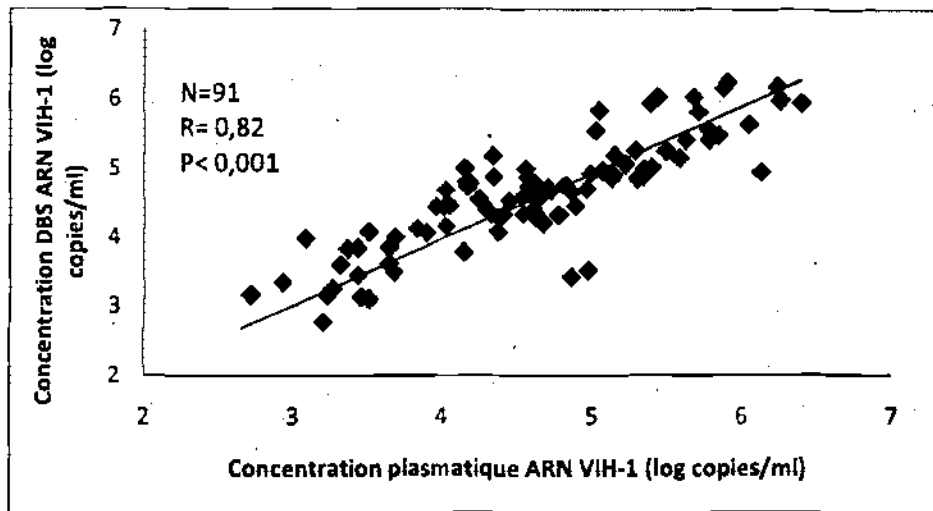


Figure 12 : Corrélation des charges virale ARN VIH-1 plasmatique et DBS chez les mères infectées par le VIH-1 sans traitement ARV

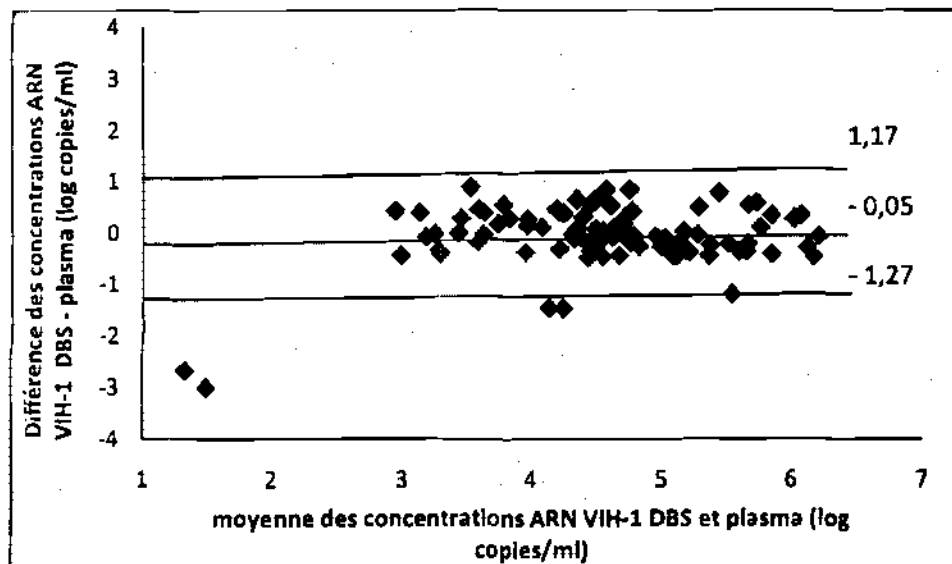


Figure 13: Bland-Altman, différence entre les concentrations d'ARN VIH-1 plasma et DBS chez les mères infectées par le VIH-1 sans traitement ARV

II.4 Cinétique de la charge virale plasmatique et DBS dans le suivi thérapeutique

Cette partie a concerné 13 femmes traitées par HAART. 52 plasmas et 41 DBS ont été testés à différent timing sur une période de plus de 12 mois.

- On a obtenu 25 échantillons de plasma (avec un seuil à 5000 copies/ml) montrant une bonne efficacité des HAART. Pour ces 25 échantillons, malheureusement, quand les DBS n'étaient pas pré-traités par de la DNase, 13 ont présenté des CV positives. En revanche, quand on a traité ces DBS avec de la DNase, tous sont devenus indétectables comme les plasmas.
- Pour les échantillons de plasma montrant un échec virologique, les DBS (qu'ils soient traités ou non par de la DNase) étaient aussi positifs.

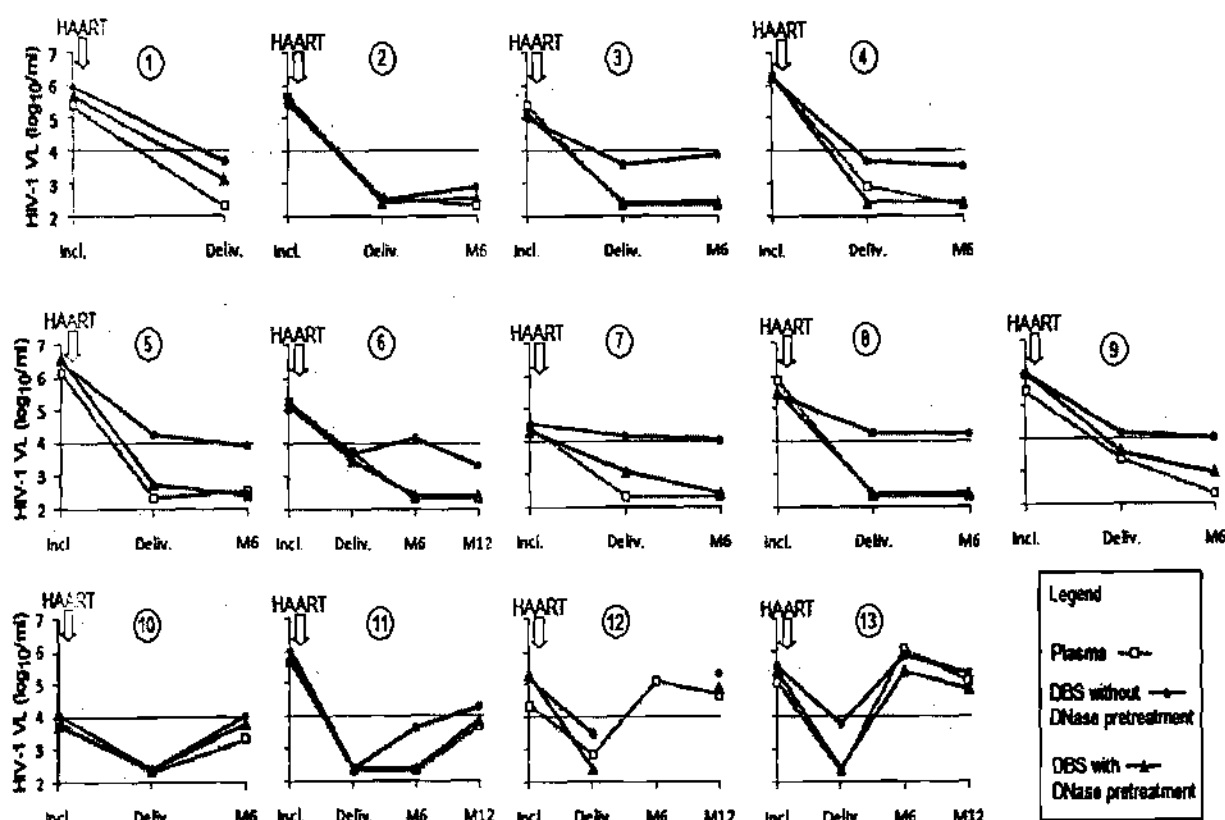


Figure 14: Comparaison de la cinétique des charges virales ARN VIH-1 plasmatique et DBS dans le suivi thérapeutique chez 13 femmes sous HAART

DISCUSSION

I. PERFORMANCE ANALYTIQUE DES DBS

1.1 Limite de détection de la technique appliquée au DBS

Le kit d'amplification Generic HIV-1 charge virale a été validé sur des échantillons de plasma au seuil de 300 copies d'ARN VIH-1/ml ($2,48 \log_{10}/\text{ml}$) par ROUET en 2005 (39). Dans notre étude, nous avons adapté ce kit pour l'amplification de l'ARN VIH-1 à partir des spots de sang total séchés sur papier filtre (DBS) et déterminé la limite à 1550 copies d'ARN VIH-1/ml ($3,19 \log_{10}/\text{ml}$). La plupart des études sur les DBS ont utilisés des tests commerciaux comme ABBOTT, EASYQ, ROCHE.

S. M. Lofgren et al en 2009 avec le *m* 2000rt d'Abbott ont utilisés le seuil de 1000 et 10000 copies/ ml pour déterminer la sensibilité et la spécificité des DBS. (40)

Une étude menée aux USA par Amy Loftis and al a obtenu un seuil à 10^2 - 10^3 pour 2 spots de 50 μ l sur le *m* 2000rt d'Abbott (3)

1.2 Répétabilité intra-essai

La répétabilité (précision dans la série) mesure le degré de similarité entre les résultats obtenus en appliquant un même mode opératoire. La moyenne des contrôles faiblement positifs montre une faible variabilité intra essai ($3,65 \pm 0,23$) la dispersion autour de la moyenne est assez faible. Le test appliqué aux DBS donne une bonne performance analytique (précision et exactitude).

Rouet et al en 2005 ont obtenu des résultats inférieurs au notre (standard de déviation de **0,12**) avec le plasma sur le même appareil (ABIprism 7000) en Côte d'Ivoire.(39)

1.3 Reproductibilité inter-essai

La reproductibilité (précision entre série) mesurée à partir des contrôles sur 10 tests de RT PCR à plusieurs jours d'intervalles, nous avons obtenus une moyenne de **3,32 (SD, $\pm 0,30$) \log_{10}/ml** et un coefficient de variation (CV) de 9,03%. Il n'y a pas de grande variation de la reproductibilité des DBS avec la technique utilisée.

C. T. Kané et al en 2008 ont étudié la reproductibilité de l'ARN VIH-1 dans les DBS et ont obtenus des standards de déviation en moyenne de **0,12 ; 0,18 et 0,18 \log_{10} IU/ml** sur trois tests indépendants. (20)

Chin-Yih Ou et al en 2007 ont mesuré les variations inter-run à partir d'un panel de 4 points de standards et ont obtenu des coefficients de variation de **44 ; 31 ; 42 ; 20%** respectivement des valeurs des Ct.(35)

1.4 Impact de la durée de conservation des DBS sur la fiabilité des résultats obtenus par les DBS

Dans notre étude, le temps de conservation (2 jours à 3 ans et demi) des DBS à -20°C n'a pas eu d'impact significatif sur les résultats des charges virales comparés aux résultats plasmatiques. Les DBS peuvent donc rester stables à -20°C dans des plastiques contenant des dessiccants et fermés pendant presque 4 ans, d'autres études sur la stabilité des DBS ont montré des résultats similaires ainsi :

Caroline Mitchell et al en 2008 ont montré que les DBS étaient plus stable conservé à -20°C qu'à 37°C sur une période de 2 à 12 mois (7).

Don Brambilla et al en 2003 ont montré que les DBS étaient stables conservés à -70°C pendant plus d'une année (6).

W. Leelawiwat et al en 2009 montre dans leur étude que l'ADN était plus stable que l'ARN dans les mêmes conditions de conservation et quelque soit la concentration en acide nucléique. par contre les DBS conservés à -20°C avaient une bonne reproductibilité lorsque les taux d'ARN étaient élevés comparés à ceux dont les taux étaient très faibles et -70°C était la température idéale de conservation des DBS (22).

D'autres études ont montré qu'il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les valeurs de charge virales de l'ARN VIH - 1 DBS conservé à température ambiante (37°C) pendant une période de 8 à 15 jours selon C. Kane et al en 2008 et entre 18 - 25 °C pendant une période de 80 jours (40) (20).

II. EVALUATION CLINIQUE DES DBS

II.1 Diagnostic précoce des enfants exposés au VIH

Dans les pays à ressources limités comme le Burkina Faso, la mesure de la charge virale plasmatique n'est réalisée que dans les laboratoires de référence et nécessite des équipements, des infrastructures et des conditions spécifiques de transport, de conservation et de stockage des échantillons biologiques. L'utilisation des DBS pour la mesure de la charge virale dans le suivi des patients sous traitement ARV et dans le diagnostic pédiatrique précoce des enfants exposés est une technique alternative de choix. Depuis plus d'une dizaine d'années, de nombreuses études visent à montrer que les DBS peuvent être utilisés en lieu et place du plasma dans la mesure de charge virale du VIH-1 (8) (6). De ce fait, des tests commerciaux et des tests maisons sont mis au point et évalués.

Dans notre étude nous avons utilisé la combinaison des tests de Biomérieux (MiniMag NucliSens) pour l'extraction et le test de l'ANRS pour l'amplification. Le test de Biomérieux

(MiniMag NucliSens) est très performant pour l'extraction des acides nucléiques (ADN, ARN) la présence de l'ARN du virus et de l'ADN proviral dans les extraits DBS (35) rend la technique beaucoup plus sensible pour l'amplification. Nous avons obtenu pour le diagnostic précoce des enfants exposés au VIH une sensibilité et une spécificité de 100%. Pour la mesure des charges virales des mères infectées, nous avons obtenu une sensibilité 97,8% comparé aux valeurs plasmatiques.

De nombreuses études réalisées dans le cadre du diagnostic précoce des enfants exposés au VIH-1 ont également montrés des résultats similaires. Ainsi,

W. Leelawiwat et al en 2009 a obtenu une sensibilité et une spécificité de 100% avec les tests Roche (Amplicor v1.5 DNA PCR) et Biomérieux (RNA NASBA) (22).

G. G. Sherman et al obtiennent une sensibilité de 100% et une spécificité de 99,6% en 2005 avec le test de Roche Amplicor v1.5 (11).

S. M. Lofgren et al en 2009 avec le *m* 2000rt d'Abbott ont obtenu une sensibilité et une spécificité de 100% et 0,99 au seuil de 1000 copies/ml et 100% de sensibilité et spécificité pour un seuil de 10000 copies/ml.(40)

R. R. Lilian et al en 2010 sur le NucliSens EasyQ obtiennent une sensibilité de 100% et une spécificité de 96,3% (37).

II.2 Corrélation et concordance des CV plasmatiques et DBS

Les coefficients de corrélation $R=0,89$ et $0,82$ montre qu'il y a une bonne association entre les valeurs des charges virales plasmatique et DBS. Les tests que nous avons utilisés offrent très peu de différence entre les valeurs. D'autres études montrent des résultats similaires aux nôtres.

Comba T. Kane et al ont obtenu une corrélation de 0,90 en 2008 (20).

Marconi M. et al en 2009 ont évalué le test d'Abbott Real-Time sur les DBS et ont obtenu une corrélation de 0,882 (23).

Sarah. M. Lofgren et al en 2009 ont obtenu une corrélation de 0,97 (40).

Les Bland-Altman montrent une bonne concordance entre les valeurs DBS et plasmatique.

II.3 Cinétique de la charge virale plasmatique et DBS dans le suivi thérapeutique

Au seuil de 5 000 copies/ml les DBS donnent plus de résultats détectables chez les patientes en succès virologique que les plasmas. Ses résultats ont également été observé par S. M. Lofgren et al en 2009 qui a obtenu 54% d'échec virologique avec le plasma contre 55% avec les DBS d'où une sensibilité de 100% et une spécificité de 0,97%(40).

Le traitement par la DNase des extraits a permis d'améliorer la spécificité dans notre étude cette différence dans le suivi virologique est due à la présence dans les extraits DBS de l'ADN proviral et de l'ARN viral (8, 40).

LES RECOMMANDATIONS ET SUGGESTIONS

Aux autorités politiques nationales impliquées dans la lutte contre le VIH/SIDA :

Nous recommandons et suggérons un engagement réel dans le volet biologique de la prise en charge des malades par :

- La mise à disposition dans les laboratoires de référence et les centres de recherche des appareils, des équipements et des réactifs de laboratoires, la formation continue du personnel.
- Une meilleure opérationnalisation des résultats de la recherche dans le domaine du VIH/SIDA notamment par la mise en œuvre effective d'utilisation des DBS dans la prise en charge biologique.

A travers notre étude nous avons montrés que les DBS peuvent être utilisés pour le diagnostic précoce des enfants exposés au VIH et pour le suivi biologique des personnes infectées par le VIH sous traitement ARV. Cette étude s'est déroulée au niveau laboratoire, une étude sur le terrain dans les conditions réel d'utilisation dans notre contexte doit être réalisée en vue de valider la technique pour sont utilisation à grande échelle.

CONCLUSION

Dans la lutte contre le VIH/SIDA de nombreux progrès ont été menés en vue de réduire la prévalence et d'améliorer la prise en charge globale des personnes infectés et affectées par le VIH/SIDA. Des structures décentralisées de prise en charge des PVVIH ont permis d'accroître l'accès aux traitements antirétroviraux devenus presque gratuits, toutefois cette prise en charge reste basée sur la clinique. Selon l'OMS (recommandation 2009) il y a des inconvénients bien connus à ne se fier qu'à la surveillance clinique pour déterminer à quel moment les gens ont besoin d'un traitement antirétroviral ou commencent à ne plus répondre à leur schéma thérapeutique, d'où le rôle accru du suivi biologique, notamment la numération des CD4 et de la charge virale pour améliorer la qualité du traitement et des soins de l'infection à VIH.

La mesure de la charge virale est un paramètre essentiel dans la prise en charge des personnes infectées par le VIH, et pour le diagnostic pédiatrique précoce des enfants exposés au VIH. Dans les pays à ressources limités, les techniques de PCR utilisées pour la mesure des CV de l'ARN VIH-1 sont encore considérées comme un luxe réservé aux laboratoires de référence et aux centres de recherche, limitant ainsi l'accessibilité de ces tests.

Les résultats de notre étude montrent que les DBS comme technique de prélèvement peuvent être utilisés en remplacement du plasma. En effet nous avons obtenu une bonne performance analytique et clinique des DBS en comparaison aux résultats plasmatiques chez les enfants et chez les adultes.

L'utilisation des DBS aussi bien pour le diagnostic que pour le suivi des personnes infectées trouve sa place dans notre contexte de pays à ressources limités, car les DBS offrent un moyen de prélèvement, de transport, de conservation et de stockage facile et moins coûteux que le plasma.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **AasaChapman, M. M. I., A. Hayman, P. Newton, D. Cornforth, I. Williams, P. Borrow, P. Balfe, and A. McKnight.** 2004. Development of the antibody response in acute HIV-1 infection. *Aids* **18**:371-381.
2. **Amellal, B., C. Katlama, and V. Calvez.** 2007. Evaluation of the use of dried spots and of different storage conditions of plasma for HIV-1 RNA quantification. *Hiv Medicine* **8**:396-400.
3. **Amy Loftis, R. K., Karissa McCall-Culbreath, Susan Fiscus, and Julie Nelson.** 2009. Presented at the IAS 2009, Cape Town.
4. **Bagory, M.** 2006. PCR et RT-PCR en temps réel.
5. **Barre Sinoussi, F., and L. Montagnier.** 2009. Françoise Barre-Sinoussi and Luc Montagnier share the 2008 Nobel Prize for Physiology and Medicine for their discovery of the human immunodeficiency virus (HIV). *Aids* **23**:1.
6. **Brambilla, D., C. Jennings, G. Aldrovandi, J. Bremer, A. M. Comeau, S. A. Cassol, R. Dickover, J. B. Jackson, J. Pitt, J. L. Sullivan, A. Butcher, L. Grosso, P. Reichelderfer, and S. A. Fiscus.** 2003. Multicenter evaluation of use of dried blood and plasma spot specimens in quantitative assays for human immunodeficiency virus RNA: measurement, precision, and RNA stability. *J Clin Microbiol* **41**:1888-1893.
7. **Caroline Mitchell, C. J., Donald Brambilla, and coll** 2008. Diminished Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA Yield from Dried Blood Spots after Storage in a Humid Incubator at 37°C Compared to -20°C. *J. Clin. Microbiol.* **46**:2945-2949.
8. **Cassol, S. A., M. J. Gill, R. Pilon, M. Cormier, R. F. Voigt, B. Willoughby, and J. Forbes.** 1997. Quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA from dried plasma spots collected on filter paper. *J Clin Microbiol* **35**:2795-801.
9. **Damond, F.** les outils du diagnostic virologique dans l'infection à VIH, . www.reseau-paris-nord.com.

10. **ELISE POITRA, A. H.** Décembre 2002. la PCR en temps réel: principe et application. *reviews in Biology and Biotechnologie* **2** 2-11.
11. **Gayle G. Sherman, G. S., Stephanie A. Jones, Pamela Horsfield, Wendy S. Stevens.** 2005. Dried Blood Spots Improve Acces to HIV Diagnosis and Care for Infants in Low-Resource Settings. *J.Acquir Immunè Defic Syndr* **38**:615-617.
12. **Ginsburg, A. S. M., Anna; Wilfert,Catherine.** 2006. Diagnosis of pediatric human immunodeficiency virus infection in resource-constrained settings. *the pediatric infectious desease* **25**:pp 1057-1064.
13. **Hammer, S. M., D. A. Katzenstein, M. D. Hughes, H. Gundacker, R. T. Schooley, R. H. Haubrich, W. K. Henry, M. M. Lederman, J. P. Phair, M. Niu, M. S. Hirsch, and T. C. Merigan.** 1996. A trial comparing nucleoside monotherapy with combination therapy in HIV-1 infected adults with CD4 cell counts from 200 to 500 per cubic millimeter. AIDS Clinical Trial Groups Study 175 Team. *N Engl J Med* **335**:1081-1090.
14. **Higuchi, R., G. Dollinger, P. S. Walsh, and R. Griffith.** 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)* **10**:413-417.
15. **Hutchinson, J. F.** 2001. The Biology And Evolution of HIV. *Annu. Rev. Anthropol.* **30**:85-108.
16. **Ian Dorval, F. G.** 2006. Microbiologie, PCR en temps réel en routine: application maison ou trousse? *spectra biologie* **154**:39-43.
17. **INSD.** 2008. Annuaire statistique
18. **INSD.** 2006. Recensement général de la population et de l'habitation.
19. **Jean-Marie Huraux, J.-C. N., Henri Agut, Hélène Peigue-Lafeuille.** 2003. *Traité de virologie médicale.* ESTEM, Paris.
20. **Kane, C. T., H. D. Ndiaye, S. Diallo, I. Ndiaye, A. S. Wade, P. A. Diaw, A. Gaye Diallo, and S. Mboup.** 2008. Quantitation of HIV-1 RNA in dried blood spots by the

- real-time NucliSENS EasyQ HIV-1 assay in Senegal. *Journal of Virological Methods* **148**:291-295.
21. **Lambert, J. S., D. R. Harris, E. R. Stiehm, J. Moye, M. G. Fowler, W. A. Meyer III, J. Bethel, and L. M. Mofenson.** 2003. Performance characteristics of HIV-1 culture and HIV-1 DNA and RNA amplification assays for early diagnosis of perinatal HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* **34**:512-519.
 22. **Leelawiwat, W., N. L. Young, T. Chaowanachan, C. Y. Ou, M. Culnane, N. Vanprapa, N. Waranawat, P. Wasinrapee, P. A. Mock, J. Tappero, and J. M. McNicholl.** 2009. Dried blood spots for the diagnosis and quantitation of HIV-1: Stability studies and evaluation of sensitivity and specificity for the diagnosis of infant HIV-1 infection in Thailand. *Journal of Virological Methods* **155**:109-117.
 23. **Marconi A., B. M., Comastri G., Pulvirenti R., Gennari W., Tagliazuki S., Percorari M., Borghi V., Marri D., Zazzi M.** 2009. Evaluation of Abbott real time HIV-1 quantitative assay with dried blood spot specimens. *clinical microbiologie and infection* **15**:93-97.
 24. **Martine Peeters, M.-L. C., Eric Delaporte.** 2008. Phylogénie des SIV et des VIH : Mieux comprendre l'origine des VIH. *Medecine/Science*:621-8.
 25. **Mellors, J. W., M. A., J. V. Giorgi, J. B. Margolick, C. J. Tassoni, P. Gupta, L. A. Kingsley, J. A. Todd, A. J. Saah, R. Detels, J. P. Phair, and C. R. Rinaldo.** 1997. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med* **126**:946-954.
 26. **Miriam Wittek , M. S., Hans Wilhelm Doerr , Annemarie Berger.** 2007. Molecular assays for monitoring HIV infection and antiretroviral therapy. *Expert Revue molecular Diagnosis* **7**:237-246.
 27. **Mullis, K. B., and F. A. Faloona.** 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**:335-350.
 28. **Mwaba, P., S. Cassol, A. Nunn, R. Pilon, C. Chintu, M. Janes, and A. Zumla.** 2003. Whole blood versus plasma spots for measurement of HIV-1 viral load in HIV-infected African patients. *Lancet* **362**:2067-2068.

29. **NucliSens**. 2008. Amplification avec la technique NASBA et détection en temps réel.
30. **O'Brien, W. A., P. M. Hartigan, E. S. Daar, M. S. Simberkoff, and J. D. Hamilton**. 1997. Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4+ lymphocyte counts predict both response to antiretroviral therapy and therapeutic failure. Veterans Affairs Cooperative Study Group on AIDS. *Ann Intern Med* **126**:939-945.
31. **O'Brien, W. A., P. M. Hartigan, D. Martin, J. Esinhart, A. Hill, S. Benoit, M. Rubin, M. S. Simberkoff, J. D. Hamilton, and the Veterans Affairs Cooperative Study Group on AIDS**. 1996. Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4+ lymphocyte counts and the risk of progression to AIDS. *N Engl J Med* **334**:426-431.
32. **OMS**. 2009. Towards universal access: scaling up priority HIV/AIDS intervention in the health sector.
33. **ONUSIDA**. 2006. Epidémie du SIDA dans le monde 02.
34. **ONUSIDA**. 2007. le point sur l'épidémie de SIDA: rapport spécial sur la prévention du sida
35. **Ou, C.-Y., H. Yang, S. Balinandi, S. Sawadogo, V. Shanmugam, P. M. Tih, C. Adje Toure, S. Tancho, L. K. Ya, M. Bulterys, R. Downing, and J. Nkengasong**. 2007. Identification of HIV-1 infected infants and young children using real-time RT PCR and dried blood spots from Uganda and Cameroon. *J Virol Methods* **144**:109-114.
36. **Pierre-Marie GIRARD, C. K., Gilles PIALOUX**. 2004. VIH, doin ed.
37. **R. R. Lillian, K. B., G. G. Sherman**. 2010. Early diagnosis of human immunodeficiency virus-1 infection in infants with the NucliSens Easy Q assay on dried blood spots. *Journal of Clinical Virology*:4.
38. **Rouet, F., M. L. Chaix, E. Nerrienet, N. Ngo-Giang-Huong, J. C. Plantier, M. Burgard, M. Peeters, F. Damond, K. D. Ekouevi, P. Msellati, L. Ferradini, S. Rukobo, V. Maréchal, N. Schvachsa, L. Wakrim, C. Rafalimanana, B. Rakotoambinina, J. P. Viard, J. M. Seigneurin, and C. Rouzioux**. 2007. Impact of HIV-1 genetic diversity on plasma HIV-1 RNA quantification: usefulness of the

- Agence Nationale de Recherches sur le SIDA second-generation long terminal repeat-based real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Acquir Immune Defic Syndr* **45**:380-388.
39. Rouet, F., D. K. Ekouevi, M. L. Chaix, M. Burgard, A. Inwoley, T. D. Tony, C. Danel, X. Anglaret, V. Leroy, P. Msellati, F. Dabis, and C. Rouzioux. 2005. Transfer and evaluation of an automated, low-cost real-time reverse transcription-PCR test for diagnosis and monitoring of human immunodeficiency virus type 1 infection in a West African resource-limited setting. *J Clin Microbiol* **43**:2709-2717.
40. Sarah M. Lofgren, A. B. M., Caroline C. Chevallier, Anangisye I. Malabeja, Sally Edmonds, Ben Amos, David J Sifuna, Lorez Von Seidlein, Werner Schimana, Wendy S. Stevens, John A. Bartlett, and John A. Crump. 2009. Evaluation of a dried blood spot HIV-1 RNA program for early infant diagnosis and viral load monitoring at rural and remote healthcare facilities. *AIDS* **23**.
41. Sherman, G. G., G. Stevens, S. A. Jones, P. Horsfield, and W. S. Stevens. 2005. Dried blood spots improve access to HIV diagnosis and care for infants in low-resource settings. *J Acq Immune Defic Syndr* **38**:615-617.
42. TIndyebwa D., J. K., P. Musoke, B. Eley, R. Nduati, H. Coovadia, R. Bobart, D. Mbori-Ngacha, M. Pat Kieffer, 2006. Manuel sur le SIDA pédiatrique en Afrique. Réseau Africain pour les soins aux enfants affectés par le SIDA.
43. UNAIDS. 2006. Report on the global AIDS epidemic. December 2006 <http://www.unaids.org>.
44. Warszawski, J., R. Tubiana, J. Le Chenadec, S. Blanche, J. P. Teglas, C. Dollfus, A. Faye, M. Burgard, C. Rouzioux, and L. Mandelbrot. 2008. Mother-to-child HIV transmission despite antiretroviral therapy in the ANRS french perinatal cohort. *Aids* **22**:289-299.
45. World Health Organization. 2008. HIV/AIDS departement toward universal access, scaling up priority HIV/AIDS intervention in the health factor. Progress Report. Geneva: World Health Organization:Available at: <http://www.who.int/hiv/>.