

BURKINA FASO

UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU

UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE EN SCIENCES
DE LA SANTE (UFR/SDS)

SECTION PHARMACIE



Année universitaire 2009-2010

Thèse n° : 95

**INTERET DU « DRIED BLOOD SPOT » OU DBS DANS LE DIAGNOSTIC
PRECOCE DE L'INFECTION PAR LE VIH-1 CHEZ LES ENFANTS DE MOINS
DE 18 MOIS NES DE MERE INFECTEE : COMPARAISON DES RESULTATS
DE LA PCR-ARN PLASMATIQUE ET DE LA PCR-ADN SUR DBS**

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 12 Juillet 2010

Pour l'obtention du grade de **DOCTEUR EN PHARMACIE**

(DIPLOME D'ETAT)

Par

SONTIE Ba-Nébhane Sonia

Née le 18 septembre 1983 à Bobo-Dioulasso (Burkina Faso)

JURY

Directeur de thèse :

Pr Titulaire Rasmata OUDRAOGO/TRAORE

Président : Pr Ag. Issa T. SOME

Membres : Dr Fla KOUETA

Dr Mahamoudou SANOU

A NOS MAITRES ET JUGES

A notre maître et président du jury,

Le Professeur Agrégé Touridomon Issa SOME

Maître de conférences en Chimie Analytique à l'UFR/SDS

Cher maître, vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider ce jury.

Nous avons bénéficié de vos enseignements et surtout de vos conseils au cours de notre cursus universitaire. Votre rigueur dans le travail, la clarté de vos enseignements nous ont beaucoup impressionnés.

Soyez rassuré de notre profond respect.

A notre maître et directeur de thèse,

Le Professeur Titulaire Rasmata Ouédraogo/Traoré

Professeur Titulaire en Bactériologie-Virologie à l'UFR-SDS

Chef de service du Laboratoire d'analyse biomédicale au CHUP-CDG

Chère maître, c'était un grand honneur de travailler sous votre direction. Nous admirons votre passion et votre rigueur scientifique, votre simplicité et votre goût du travail bien fait. Malgré vos multiples et lourdes responsabilités vous avez bien voulu diriger ce travail dont vous êtes l'initiatrice.

Puisse t-il être à la hauteur de vos attentes. Sincères reconnaissances.

A notre maître et juge,

Le Docteur Fla Koueta

Maître assistant au département de pédiatrie à l'UFR/SDS

Cher maître, vous nous faites l'honneur de juger notre travail. Nous admirons votre dévouement dans le combat quotidien pour la prise en charge de l'infection par le VIH/SIDA chez les enfants.

Nous vous remercions d'avoir accepté de siéger dans ce jury malgré vos multiples occupations.

A notre maître et juge,

Le Docteur Mahamoudou Sanou

Assistant au département de Bactériologie-Virologie à l'UFR-SDS

Directeur Général du Centre National de Transfusion Sanguine (CNTS)

Cher maître, recevez nos sincères remerciements pour l'honneur que vous nous faites d'accepter de juger notre travail malgré vos multiples responsabilités

REMERCIEMENTS

A toutes les mères,

Qui ont bien voulu accepter que leurs bébés fassent partie de l'étude.

Au personnel des différents services de PTME des CMA de PISSY, PAUL VI,

Merci pour votre bonne collaboration.

Au personnel du laboratoire d'analyse biomédicale du CHUP-CDG :

Mr BANCE Kassoum, Mr YONLI Firmin, Mr ZONGO Salifou, Mr KAFANDO Anatole, Mr KONATE, Mme SOME Clarisse, merci pour votre collaboration et votre soutien permanent au cours de nos travaux.

Au Docteur Anicet DAHOUROU

Merci pour le soutien et les conseils dont nous avons bénéficié de votre part pour l'élaboration de notre travail.

A Mme Diane VALEA du Centre Muraz de BOBO DIOULASSO

Sincères remerciements pour votre grand soutien.

Au Docteur BARRY du CHUP-CDG,

Merci pour vos précieux conseils et votre disponibilité qui ont conduits et guidé nos travaux.

Aux Docteurs Masséta MAIGA, Colette ZOUNGRANA et Yacouba SOURABIE

Pour votre aide et vos conseils

A Mr Anthony SOME attaché de sante en épidémiologie,

Merci pour votre aide et votre disponibilité.

A ma cousine Marie-Louise

Merci à toi pour ta disponibilité car tu as œuvré beaucoup à la finalisation de ce travail.

DEDICACES

A DIEU le père tout puissant :

Mon Dieu tu as fait pour moi des merveilles. Que ton nom soit glorifié à jamais dans mon cœur.

A mon père et à ma mère :

Papa, Maman, vous avez toujours été là pour moi. Je remercie Dieu de vous avoir comme parents. Vos conseils, vos encouragements, vos bénédictions, et surtout votre amour me sont d'un soutien inestimable Je ne peux que vous dire merci pour toutes ces années que vous avez consacré à mon éducation et je sais que ce travail vous l'attendez avec joie et fierté. Puisse t-il être à la hauteur de votre attente. Que le Seigneur vous accorde longue vie pour que vous soyez présents à chaque étape importante de ma vie comme celle-ci.

A mes frères Thierry et Anatole pour toutes ces années de fraternité que nous n'avons cessé de cultiver entre nous et qui fait la fierté des parents. Puisse Dieu vous accompagner dans la réussite de vos études.

A mon frère Aimé Karol (In memoriam) : tu es parti si tôt. Je suis sûre que de là où tu es, tes prières ont contribué à l'élaboration de ce travail. Puisse ton âme reposer en paix. Tu me manques beaucoup.

A mon fils Darryl Marie Aimé : tu es ce qui est de plus précieux pour une mère : un enfant. Je prie le bon Dieu qu'il m'assiste afin que je puisse être une bonne mère pour te donner l'éducation qu'il faut afin que tu sois un « Homme ». Et j'espère que mon amour, mes conseils et mes bénédictions seront pour toi une force dont tu t'armeras pour braver les difficultés de la vie. Saches que les châtements que tu recevras ne sont que la preuve que ta maman t'aime fort. J'aimerais aussi qu'un jour tu me donnes la joie d'assister à un

évènement important de ta vie comme celui que j'ai la joie de partager aujourd'hui avec mes parents

A mon fiancé Désiré Lucien DAHOUROU : je suis heureuse parce que mon chemin t'a croisé. Tu as toujours été là dans mes moments difficiles et tu as suivi de près ce travail dont je pense est aussi le tien.

J'espère que la force de notre amour nous permettra de relever les défis que la vie nous lancera. Puisse Dieu nous permettre d'offrir un foyer digne de ce nom à nos enfants qui sont nos biens les plus précieux sur cette terre. Je t'aime.

A mes cousins et cousines, Sonia, Mariam, Fati, Sandrine, Joseph, David, Jonathan, Serge, Issa, Lassina, Joel, Josiane, Ludovick, Isabelle.

A Mr et Mme NIKIEMA :

Vous m'avez ouvert les portes de votre foyer et je m'y suis sentie comme chez moi. Votre amour, vos bénédictions et votre soutien m'ont aidé pour mener à bien ce travail qui j'espère sera à la hauteur de l'estime dont vous m'avez porté.

A Mr et Mme ILBOUDO :

Tonton, Tantie, vous n'avez pas cessé de me porter dans vos prières de tous les jours et je vous dis merci. Je vous dédie aussi ce travail car vous n'avez pas hésité à mettre à ma possession ce livre dont j'avais besoin pour élaborer la base même de ce travail.

A Mr SOMBIE Sidiki et famille :

Pour votre soutien et vos encouragements

A mes amies Sonia, Estelle, Haoua, Yvette, Safiatou Léa, Carine Nadège, Lynda, Viviane,

Amies depuis de longues dates, vous n'avez cessé chacune de me soutenir et de me porter dans vos prières. Puisse cette amitié qui nous lie se perpétuer pour les combats futurs et unir aussi nos enfants.

A mes amies et camarades de classe Anita, Estelle,

Je n'oublie pas ces moments forts de « boilo » qu'on faisait pour passer en classe supérieure. Ainsi, d'année en année, unies comme les doigts de la main nous avons le même but : « réussir ». Aujourd'hui nous avons gagné une bataille. Que ces liens qui nous unissent se perpétuent dans l'amitié sincère.

A mes camarades de classe, Pascal, Nathalie, Colette, Massèta, Inna, Inesse, Kadi, Carine, Dori, Badolo, Saibou, Sabine, Yonli, Laeticia

Que ses moments d'entente passés ensemble tout au long de notre formation soient le gage d'une bonne collaboration pour demain.

A tous les enfants de moins de 18 mois nés de mère infectée par le VIH,

Puisse ce travail contribuer à l'amélioration de votre prise en charge.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Repartition des enfants en fonction du type d'allaitement.....	70
Tableau II : Type d'allaitement en fonction de l'âge	70
Tableau III : Répartition des enfants en fonction des résultats de la PCR-ARN	72
Tableau IV : Résultats de la PCR-ARN en fonction de la sérologie	73
Tableau V : Résultats de la PCR-ARN en fonction du traitement ARV.....	74
Tableau VI : Résultats de la PCR-ARN en en fonction de la sérologie et de l'âge	74
Tableau VII : Résultats de la PCR-ADN.....	75
Tableau VIII : Résultats de la PCR-ADN en fonction de la sérologie des enfants	75
Tableau IX : Résultats de la PCR-ADN en fonction du traitement ARV	76
Tableau X : Résultats de la PCR-ADN et de la sérologie en fonction des tranches d'âge.....	77
Tableau XI : Comparaison des techniques PCR-ARN et PCR-ADN	77

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure du VIH1	15
Figure 2 : Cycle de réplication du VIH.....	19
Figure 3 : Histoire naturelle de la maladie.....	22
Figure 4 : Evolution des marqueurs immunologiques et virologiques.....	25
Figure 5 : Etapes d'un cycle de PCR.....	28
Figure 6 : Cinétique de la réaction de PCR.....	31
.....	
Figure 7 : Principe de la chimie TaqMan.....	33
Figure 8 : Hotte à flux laminaire vertical Mini flux II (ESI FLURANCE)	50
Figure 9 : Site de piqure (en vert).....	53
Figure 10 : une carte de DBS	54
Figure 11 : Thermocycleur (ABI PRISM 7000).....	60
Figure 12 : Répartition des enfants en fonction du type de VIH.....	71

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

°C : degré celcius

nm : nanomètre

µL : microlitres

mL : millilitres

mmol : millimoles

mmol/ L:millimole par litre

AAE : Allaitement Artificiel Exclusif

Ac: Anticorps

ADN : Acide Désoxyribonucléique

Ag : Antigène

AM : Allaitement Mixte

AME : Allaitement Maternel Exclusif

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ARV: Antirétroviral

BET : Bromure d'Ethydium

BM :Biologie Moléculaire

CA :Capside

CCR5 : Cysteine Chemokine Receptor 5

CDC : Center for Diseases Control and prevention

CMV: Cyto-Mégalo-Virus

CNLS/IST: Conseil National de lutte contre le SIDA et les Infections Sexuellement Transmissibles

Cp: Comprimé

CRF: Circulating Recombinant Forms

CsCl :Chlorure de Césium

Ct: Cycle threshold

CTL: Lymphocytes T cytotoxiques

CV: Charge Virale

CXCR4: Chemokine CXC Receptor 4

DNTP :DésoxyNucléotides Triphosphate

DNase : Désoxyribonucléase

dATP : désoxyadénine triphosphate

dCTP : désoxycytosine triphosphate

dGTP : désoxyguanine triphosphate

dTTP : désoxythymine triphosphate

EDTA: Ethylène Diamine Tétra-Acétique

ELISA:Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

env: Envelope

FRET : Fluorescence Resonance Energy Transferts

gag: group antigen

gp: Glycoprotéines

gp TM :Glycoprotéine Transmembranaire

IgM : Immunoglobulines de classe M

HLA: Human Leucocyte Antigen

HTLV: human T lymphotropic virus

INSD : Institut National de la Statistique et de la Démographie

KDa : Kilodalton

LAV : Lymphadenopathy Associated Virus

LTR: long terminal repeat

Ma : Matrice

Mg²⁺ : Magnésium

NaI : Iodure de Sodium

Nc : Nucléocapside

nef : facteur de régulation négative

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

ONUSIDA: Programme Commun des Nations Unies sur le VIH/SIDA

PCR: Polymerase Chain Reaction

PIL : Pneumopathie Interstitielle Lymphoïde

pMa : protéine de Matrice

pNc : protéine de Nucléocapside

Pol: polymérase

PSM : Poste de Sécurité Moléculaire

PTME: Prévention de la Transmission Mère-Enfant

PvVIH : Personnes vivant avec le VIH

pNc : protéine de Nucléocapside

RPM : Rotation Par Minute

RNase : Ribonucléase

RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

SIDA: Syndrome d'Immunodéficience Acquise

SP/CNLS-IST : Secrétariat Permanent du Comité National de Lutte contre le SIDA et les IST

tat : Transactivateur

Taq : *Thermus aquaticus*

Taq Pol : Taqpolymérase

TI: Transcriptase Inverse

TME : Transmission Mère-Enfant

UDI : Usagers des Drogues par voie Intraveineuse

UV : Ultra Violet

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

INTRODUCTION/ENONCE DU PROBLEME

L'infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) est une infection rétrovirale chronique, persistante, acquise par voie sexuelle, sanguine ou par transmission de la mère à l'enfant. Depuis la description des premiers cas en juin 1981 aux Etats Unis par le Center for Diseases Control and Prevention (CDC) d'Atlanta et l'identification de l'agent étiologique en 1983, de nombreuses recherches furent entreprises pour venir à bout de la maladie. Malgré les multiples progrès réalisés dans le diagnostic de la maladie et la prise en charge des personnes vivant avec le VIH (PV/VIH) l'infection déferle sur le monde et a embrasé l'Afrique [1].

Selon le rapport mondial sur l'épidémie du Syndrome de l'Immuno Déficience Acquisé publié en Décembre 2009 par l'ONU-SIDA, on estime à 33,4 millions [31,1- 35,8 millions] de PV/VIH en 2008 avec 2,7 millions [2,4- 3,0 millions] de nouvelles infections. Les femmes représentent la moitié de toutes les PV/VIH dans le monde et plus de 60% des infections en Afrique subsaharienne [2].

Les données de surveillance de l'infection à VIH s'appliquant aux enfants sont rares. On obtient les estimations chez les enfants grâce à des modèles fondés principalement sur la prévalence chez les femmes en âge de procréer, sur le taux de fécondité et sur des hypothèses relatives à la survie des enfants séropositifs. Ainsi, on estime à 2,1 millions [1,2 - 2,9 millions] d'enfants infectés de moins de 15 ans vivant avec le VIH, 90% d'entre eux vivant en Afrique subsaharienne. Parmi ces enfants, plus de 90% ont contracté la maladie au cours de la grossesse, de l'accouchement, de l'allaitement [2].

Situé au cœur de l'Afrique de l'Ouest, le Burkina Faso s'étend sur une superficie de plus de 274 200 km². Sa population était estimée en 2006 à 13 944 664 habitants [8]. Cette population est en majeure partie rurale ; seulement 15,5% vivent en milieu urbain (selon le Recensement Général de la Population et de l'Habitat en 2005). Le taux moyen d'accroissement annuel entre les deux derniers recensements (1985-1996) était de 2,37% [5]. Selon l'Institut National de la Statistique et de la Démographie (INSD) 46,4% de la population vivent en dessous du seuil de pauvreté en 2003. Sur le plan social, l'analphabétisme, le faible niveau de revenu, les pesanteurs socioculturelles et la faible accessibilité aux structures de soins demeurent autant de freins à l'amélioration de la santé des populations [5].

Comme tous les pays d'Afrique, le Burkina Faso est aussi frappé par la pandémie du SIDA. Selon l'ONU-SIDA et le SP CNLS-IST, 130 000 burkinabés vivent avec le VIH parmi lesquels on compte 61 000 femmes de plus de 15 ans et 10 000 enfants de 0 à 14 ans. La séroprévalence était de 1,6% [1,4-1,9%]. Les femmes sont les plus exposées à cette infection à cause de leur vulnérabilité biologique (la surface de la muqueuse exposée aux sécrétions de leur partenaire lors des rapports sexuels est plus étendue, possibilité de lésions de la muqueuse pendant l'acte sexuel), des pesanteurs socioculturelles (lévirat, excision, mariage précoce et forcé, polygamie, analphabétisme). Tout ceci contribue à augmenter le risque de la transmission mère-enfant du VIH. Face à ce fléau, des mesures ont été prises par le Ministère de la Santé à savoir la vulgarisation des tests de dépistage à toutes les couches sociales, le suivi et la prise en charge thérapeutique des PV/VIH, l'éducation en matière de santé sexuelle de la couche jeune, l'adoption conformément aux dispositions de l'Organisation Mondiale de la Santé(OMS), du dépistage systématique des femmes enceintes et du programme de la Prévention de la Transmission Mère-

Enfant(PTME) afin de réduire le risque de la transmission mère-enfant au cours de la grossesse, de l'accouchement et de l'allaitement initié .Ainsi, depuis 2002 nous assistons à l'amélioration progressive de la couverture géographique en PTME : 50 districts sanitaires soit un taux de couverture de 91% en 2007.

L'infection à VIH chez l'enfant répond aussi bien aux traitements Anti Rétroviraux (ARV) que celle de l'adulte. Cependant, ce traitement n'est efficace que lorsqu'il est instauré précocement. Sans traitement ARV, l'infection évolue très rapidement chez l'enfant. Dans les pays pauvres comme le Burkina Faso, approximativement 30% des enfants infectés non traités meurent avant 1 an et plus de 50% n'atteignent pas 2ans [3]. En plus les enfants non traités rencontrent des problèmes de croissance et de retard mental. Il est donc important de diagnostiquer le VIH chez les enfants nés de mères infectées le plus tôt possible afin de prévenir la maladie, les problèmes de croissance et de retard mental, et la mort chez ces enfants [4].

Au Burkina Faso, le diagnostic biologique du VIH est basé sur les tests sérologiques de dépistage des anticorps anti-VIH chez l'adulte et l'enfant de plus de 18 mois. Chez l'enfant de moins de 18 mois, la présence des anticorps maternels de type IgG spécifiques acquis in utero occulte le dépistage classique et fait appel aux tests virologiques comme la PCR-ARN et ADN capables de détecter le virus lui-même ou ses composants [9]. Les techniques de réaction en chaîne de polymérase en anglais PCR (Polymerase Chain Reaction) de l'Acide Désoxyribonucléique (ADN) et de l'Acide Ribonucléique (ARN) qui sont recommandées pour le diagnostic précoce de l'infection chez le nouveau-né sont très coûteux, exigent un équipement complexe et sont rarement disponibles dans les pays en voie de développement. De ce fait les laboratoires pouvant réaliser ces examens sont peu nombreux et constituent des

laboratoires de référence où convergent des échantillons venant des structures périphériques pour analyse.

La technique de PCR-ARN plasmatique nécessite des conditions particulières de prélèvement (ponction veineuse), de conservation (respect de la chaîne de froid), de transport (tubes en verre EDTA) et de stockage (-80°C) des échantillons. Tous ces éléments constituent des barrières importantes à un accès élargi du diagnostic précoce chez le nouveau-né de mère infectée par le VIH-1. Il existe donc un besoin urgent de trouver des moyens plus simples permettant aux enfants exposés au VIH identifiés dans les structures santé primaires d'avoir accès à ce test à partir des laboratoires de références.

La technique de prélèvement sur papier filtre (DBS) pour réaliser la PCR-ADN VIH-1 à partir du sang total pourrait constituer une alternative intéressante aux prélèvements et mesures dans le plasma. Le prélèvement se fait au talon. Après dépôt d'une goutte de sang sur un papier filtre, celui-ci après séchage, peut être transporté sans nécessité de réfrigération à un laboratoire de proximité. Il est alors conservé à -20°C. De ce fait cette stratégie devrait permettre de réaliser le diagnostic précoce de l'infection par le VIH-1 chez l'enfant de moins de 18 mois né de mère infectée à partir des structures décentralisées [4].

Le but de notre travail était d'évaluer l'intérêt des DBS dans le diagnostic précoce de l'infection par le VIH-1 chez le nouveau-né de mère infectée. Les résultats obtenus par la PCR-ADN sur DBS ont été comparés avec ceux de la PCR-ARN plasmatique chez les mêmes enfants.



PREMIERE PARTIE : REVUE DE
LA LITTERATURE

I-HISTORIQUE

Le syndrome de l'Immuno-Déficienc e Acquis e (SIDA) a été décrit en 1981, devant un tableau clinique inhabituel qui était observé chez des jeunes homosexuels américains (Center for Disease Control, 1981) ; il était caractérisé par une atteinte du système lymphatique avec une survenue d'infections opportunistes associées à une immunodéficienc e sévère. La description d'autres cas dans la communauté homosexuelle et parmi les utilisateurs de drogues par voie injectable (UDI) aboutit à individualiser ce nouveau syndrome : le SIDA. L'agent étiologique fut isolé pour la première fois en 1983 à l'institut Pasteur et appelé LAV pour Lymphadenopathy Associated Virus [10] ; dans la même année aux Etats-Unis, l'équipe du professeur Gallo, isolait le même virus et le dénommait HTLV-III (Human T- Lymphotropic Virus type III [11]. En 1985, des réactions sérologiques atypiques étaient mises en évidence avec des sérums de travailleuses du sexe du Sénégal [12]. Ces observations démontraient l'existence d'un autre virus humain plus proche d'un rétrovirus simien. Ce virus a été isolé en 1986 et désigné LAV-2. En 1986, une révision taxonomique harmonisa les différentes dénominations et définit les VIH ou HIV (Human Immuno-Deficiency Virus) de type 1 et de type 2 comme agents responsables du SIDA [12].

I- EPIDEMIOLOGIE

2.1-Situation de l'épidémie dans le monde

Selon le rapport de l'ONU/SIDA publié en 2009 sur l'épidémie du SIDA le nombre total de personnes infectées par le VIH est de 33,4 millions [31,1-35,8 millions] fin 2008 (versus 33,1 millions en fin 2007) ; 2,7millions d'adultes et

d'enfants ont contracté l'infection en 2008, contre 2,5 millions en 2007 dont 430 000 enfants de moins de 15 ans. Parmi ces personnes infectées 2,0 millions sont décédés, dont 280 000 enfants. Cette réduction de l'estimation de la prévalence mondiale du sida est due aux succès des campagnes de prévention et de traitement et à l'amélioration des techniques de recueil des données en Afrique subsaharienne et en Inde (ONU/SIDA).

L'Afrique Subsaharienne reste la partie la plus touchée du monde avec 22,4 millions [20, 8-24,1 millions] de personnes infectées par le VIH soit 67% du total mondial et 75 % de décès dus au VIH en 2008.

La majorité des personnes infectées (61 %) en Afrique subsaharienne sont des femmes.

2.2-Situation de l'épidémie au Burkina Faso

L'épidémie du VIH au Burkina Faso est de type généralisée. Sur la base de la sérosurveillance sentinelle, la prévalence est estimée à 1,6% [1,4-1,9] en fin 2008. On estime à 130 000 le nombre de PV/VIH dont 61 000 femmes et 10 000 enfants de moins de 15 ans en fin 2008. La tendance générale est à la stabilisation depuis 2005. Au plan géographique les agglomérations urbaines ont une plus forte prévalence que les zones rurales soit 3,8% et 1% en 2006. La prévalence la plus élevée en 2006 reste celle de la capitale Ouagadougou avec 5,9%(selon le SP/CNLS).

La prise en charge médicale par les ARV est en plein essor [13]. Le nombre de malades sous traitement ARV est passé de 12842 en décembre 2006 à 15888 en décembre 2007 [14].

2.3- Mode de transmission

Depuis le début de l'épidémie, trois principaux modes de transmission ont été observés :

- la transmission par voie sexuelle,
- la transmission par voie sanguine,
- la transmission mère-enfant.

2.3.1-Transmission par voie Sexuelle

A l'échelon mondial, la grande majorité des infections par le VIH ont été acquises à l'occasion de rapports sexuels non protégés.

La transmission sexuelle de l'infection à VIH se fait par l'intermédiaire des muqueuses génitales ou rectales, lorsqu'elles sont en contact avec des sécrétions sexuelles ou du sang infecté. La muqueuse présente une certaine perméabilité vis-à-vis du VIH, et on peut retrouver des cellules infectées (cellules dendritiques) dans les sous muqueuses après une exposition non traumatique de l'épithélium vaginal au VIH. La muqueuse rectale par son épithélium monocellulaire est la plus susceptible à l'infection. Le facteur essentiel qui augmente le risque de transmission sexuelle est l'infectiosité du partenaire infecté, ce qui se traduit par une charge virale plasmatique élevée [15].

2.3.2-Transmission par voie Sanguine

Elle concerne principalement trois groupes de population : les UDI, les hémophiles et les transfusés et plus rarement les professionnels de santé en un lieu de soins et laboratoires victimes d'accidents exposant au sang [15].

Chez les usagers de drogues par voie injectable les pratiques de partage de seringues ou de produits entre les usagers de drogues par voie injectable en permettant l'inoculation d'une petite quantité de sang par voie veineuse d'une personne infectée à une autre, peuvent conduire à la transmission du VIH [15].

Chez les hémophiles la contamination a été liée à l'utilisation de facteurs de coagulation, produits extraits de sang et préparés depuis le début des années 1980 à partir d'un pool de milliers de dons de sang [15].

2.3.3-Transmission mère-enfant

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, in intra partum au moment de l'accouchement dans deux tiers des cas ; la période de l'allaitement présente également un risque d'infection pour l'enfant, estimé entre 5-7% [15].

Le taux de transmission materno-fœtale du VIH-1, en l'absence de thérapeutique est de l'ordre de 30-40%, et ce, quelque soit le mode de contamination de la mère, ou son origine géographique. En ce qui concerne le VIH-2, le risque de transmission serait de l'ordre de 3-4% [15].

Des facteurs liés au virus, des facteurs maternels et des facteurs liés à la susceptibilité génétique de l'enfant interviennent dans le risque de transmission du virus à l'enfant.

Les facteurs maternels les plus prédictifs sont la charge virale plasmatique et le taux de lymphocytes CD4, les autres facteurs étant un stade avancé de la maladie, une rupture prématurée des membranes [15].

En dehors du sang, du sperme, des sécrétions vaginales et du lait, le VIH a été isolé dans de nombreux liquides biologiques, notamment dans le liquide

céphalorachidien, le liquide pleural et le liquide broncho alvéolaire. Le virus a aussi été retrouvé dans la salive, les larmes, les urines mais en raison de la faible concentration virale et de la présence éventuelle de composant inactivant le virus, le risque de transmissibilité est considéré comme nul [15].

II- LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE (VIH)

3.1-Définition/Classification

Les VIH font partie de la famille des Retroviridae qui se définissent par leur structure mais surtout leur mode de réplication. Ces virus vont grâce à l'enzyme qu'ils transportent, la reverse transcriptase ou en français transcriptase inverse ou rétro transcriptase (TI ou RT) avoir leur génome retro transcrit en ADN viral qui peut alors s'intégrer dans l'ADN chromosomique de la cellule hôte sous le nom de provirus. Ce cycle répliatif est commun à l'ensemble de la famille des Retroviridae [16,17].

Actuellement la famille des rétrovirus qui recouvre en fait toute particule virale possédant une transcriptase inverse est divisée en trois sous familles selon des critères de pathologies mais aussi selon des paramètres phylogéniques [17] :

- les Oncovirus à ADN sont les rétrovirus les plus répandus. Ils sont associés à des tumeurs et à des leucémies ;
- les Lentivirus sont des virus qui provoquent des maladies à évolution lente (pneumonies, désordres neurologiques) 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 l'ensemble des continents, et le VIH 2, présent en Afrique de l'Ouest [17] ;

- les Spumavirus sont des virus identifiés chez de nombreux mammifères, mais ils ne sont associés à aucune pathologie connue chez l'homme et chez l'animal [17].

3.2-Morphologie et Structure

Les VIH-1 et VIH-2 se présentent sous forme de particules sphériques de 80-120 nm de diamètre [16, 17,18]. En microscopie électronique VIH-1 et VIH-2 présentent une morphologie similaire [17]. Ces particules sont constituées de 4 éléments : le génome, la capsid, la matrice et l'enveloppe [19]. Les virus possèdent une enveloppe externe surmontée de spicules qui entourent un noyau central ou excentré contenant la nucléocapsid. Les particules virales sont libérées de la cellule dans laquelle elles se répliquent par un processus de bourgeonnement [17].

3.2.1- L'enveloppe

L'enveloppe virale entourant la nucléocapsid est formée d'une double couche lipidique d'origine cellulaire et de deux glycoprotéines virales la glycoprotéine transmembranaire TMgp 41 qui traverse la double couche lipidique et est liée par des liaisons faibles à la glycoprotéine d'enveloppe externe (SU gp 120) l'ensemble faisant saillie à la surface du virus sous forme de spicules qui correspondent à des trimères de ces deux glycoprotéines [16]. Ces glycoprotéines d'enveloppe proviennent du clivage d'un précurseur (gp 160 pour le VIH1). Elles sont antigéniques et jouent un rôle important dans la fixation et la pénétration des VIH dans la cellule cible [20].

3.2.2-Matrice et capsid

La matrice est la couche tapissant l'enveloppe ; elle est arrangée de manière régulière isométriquement et accède de ce fait à la surface du virion. [9]. Elle mesure 5-6 nm d'épaisseur et joue le rôle de facteur stabilisant de la particule virale mature et servirait d'échaffaudage supportant les projections de surface, voire de « pont » entre nucléocapside et glycoprotéines d'enveloppe [9]. Elle est constituée d'une protéine de matrice (p17MA) et est associée à la troisième enzyme virale ou protéase [16].

La capsid encore appelée nucléoïde ou "core" comprend deux molécules d'ARN identiques, trois protéines et des enzymes virales : la transcriptase inverse ou retrotranscriptase, l'intégrase et la protéase. La capsid virale est constituée de la protéine interne dite majeure, car la plus abondante, d'un poids moléculaire de 24 KDa est la p24 CA. La protéine de nucléocapsid (p7NC) est associée aux molécules d'ARN [16].

3.2.3-Le génome

Le génome est constitué de deux molécules d'ARN comportant chacune environ 10.000 nucléotides [20]. Il est composé de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' de 3 gènes caractéristiques des rétrovirus.

- Le gène gag (group antigène) qui code pour les protéines de la structure interne du virus ;
- Le gène pol (pour polymérase) qui code pour différentes enzymes virales qui sont respectivement de l'extrémité N terminale à l'extrémité C terminale : la protéase (p10), la transcriptase reverse sous 2 formes (p 64/p67 ou p51/p53) et l'endonucléase (intégrase p34) ;

- Le gène env (pour enveloppe) qui code pour les glycoprotéines d'enveloppe [16,17].

Les VIH ont une organisation génomique complexe du fait de la présence de gènes supplémentaires régulateurs de la réplication virale qui s'expriment principalement lors de la multiplication du virus dans les cellules. Ils sont au moins au nombre de six : tat, rev, nef, vif, vpr, et vpu qui n'est présent que chez le VIH 1 tandis que vpx se retrouve chez le VIH2 [17 ,21].

Une même séquence de taille variable est présente à chaque extrémité du génome viral. Cette séquence répétée le LTR (Long Terminal Repeat) qui permet l'intégration du provirus dans le génome de la cellule hôte, contient les éléments promoteurs nécessaires à l'expression des gènes [17].

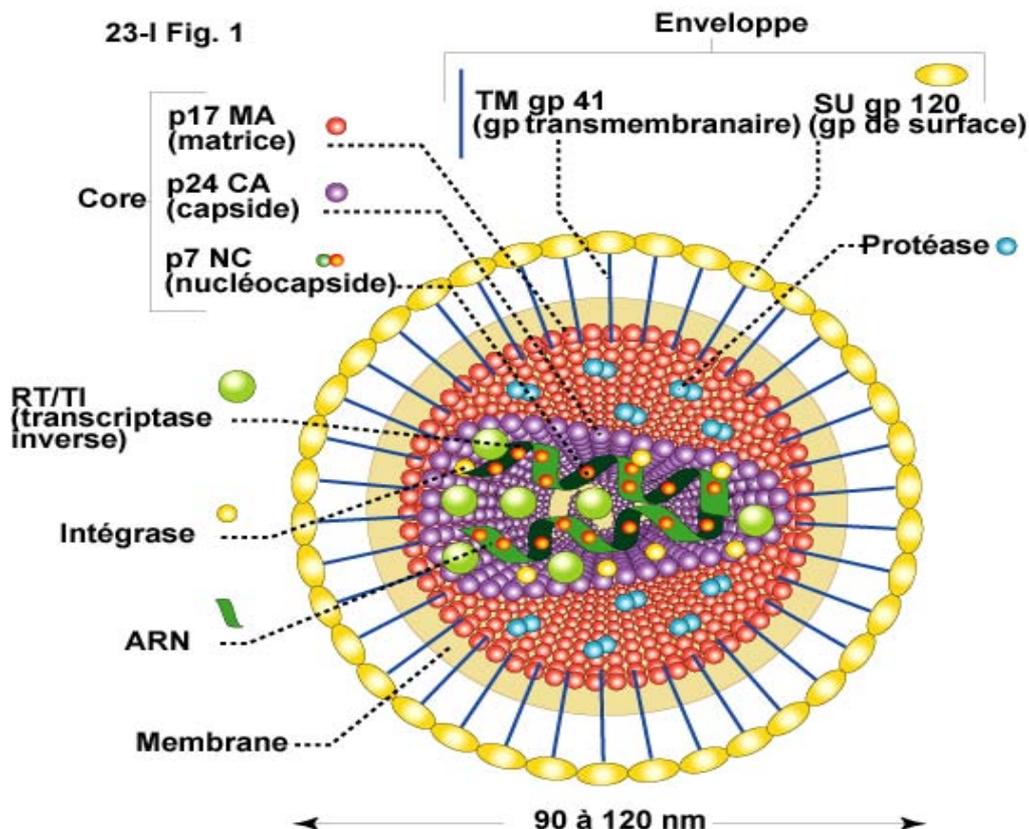


Figure 1 : Structure du VIH1 [16]

3.3-Variabilité génétique

Il existe actuellement deux types de VIH : le VIH-1 et le VIH-2. Il existe d'importantes différences entre ces deux virus.

Du point de vue génomique le VIH1 possède un gène accessoire vpu qui n'existe pas chez le VIH-2. A l'inverse, le VIH 2 possède le gène vpx qui n'existe pas chez le VIH-1 [9]. Sur la base de distances génétiques entre les VIH 1 retrouvés chez les patients, une classification des VIH 1 en trois groupes distincts appelés M, N et O, a été établie [17].

Le groupe M (majoritaire) regroupe, jusqu'à présent 9 sous types (A, B, C, D, F, G, H, J et K). Globalement, au niveau mondial, ce sont les infections par le sous type C qui sont majoritaires. Des phénomènes de recombinaison génétique chez des sujets co-infectés par des sous types de VIH-1 distincts sont également à l'origine de nouveaux virus recombinants [17].

Le groupe O (outlier), peu fréquent est retrouvé presque exclusivement en Afrique central (Cameroun, Gabon, Guinée équatoriale).

Une souche d'un nouveau groupe dit N (pour non M non O) a été identifié chez une camerounaise malade du SIDA en 1998 [22].

Ainsi au sein du groupe M on retrouve plus de 43 formes recombinantes circulantes CRF (circulating recombinant form) dont deux principales CRF01-AE (ancien sous type E) et CRF02-AG.

Le rôle des CRFS dans la pandémie en Afrique de l'ouest est considérable : au Sénégal, 80% des sous types diagnostiqués sont des sous types A, dont 85 % sont des CRF02-AG. Ainsi, plus de 70 % des virus circulant sont des CRF [17]. Au Burkina Faso, les CRF02-AG et CRF06-Cpx sont les variant les plus fréquents. Les sous types qui y sont rencontrés sont les sous types A, G, J, et K [18].

Le VIH2 comprend actuellement sept sous-types (A, B, C, D, E, F et G), les sous types A et B seuls ayant une importance épidémiologique.

L'un des obstacles à l'élaboration d'un vaccin efficace est donc représenté par ce phénomène de variabilité, qui n'est pas non plus sans conséquences sur la physiopathologie de la maladie et sa prise en charge thérapeutique [23].

3.4- Cycle de réplication de virus

Les principales étapes du cycle répliatif du VIH sont communes à tous les rétrovirus. Leur connaissance est essentielle à la compréhension de la physiopathologie de l'infection à VIH et, surtout chacune de ces étapes constitue une cible potentielle pour une thérapeutique antirétrovirale.

Etape 1 : Reconnaissance et entrée du virus

L'entrée du virus dans la cellule commence par la liaison de la glycoprotéine gp 120 du virus à son récepteur spécifique, la molécule CD4. Cette liaison de très haute affinité entraîne un changement conformationnel du gp 120 qui permet à une région spécifique de cette protéine appelée la boucle V3, de se fixer à des corécepteurs à la surface de la membrane cellulaire. Cette interaction entre gp 120 et corécepteurs met en contact la gp 41 du virus qui contient un peptide de fusion entre l'enveloppe virale et la membrane de la cellule hôte [16,17].

Etape 2 : Retrotranscription et intégration

Elle comprend d'une part la synthèse d'ADN proviral résultant de la copie de l'ARN viral grâce à la transcriptase inverse au sein d'un complexe de pré intégration ; lors de cette synthèse, des erreurs de copie à l'origine de

variabilité génétique du VIH sont effectuées par cette enzyme peu fidèle et d'autre part l'intégration de l'ADN proviral au génome de la cellule hôte grâce à l'intégrase virale.

Etape 3 : Transcription

L'ADN proviral est transcrit en ARNm par l'ARN polymérase II cellulaire à partir du LTR5' où se trouve le promoteur. Les ARNm précoces transcrits codent pour les gènes régulateurs et en particulier les gènes *tat*, *rev* et *nef*. La protéine *tat*, dont l'absence entraînerait un arrêt immédiat de la transcription, active la réplication virale. Le gène *nef* par contre, régule négativement la réplication virale. Les ARNm tardifs transcrits codent pour les protéines *gag*, *pol*, *env*, *vif*, *vpr*, *vpu* (ou *vpx*).

Etape 4 : Synthèse de protéines virales, maturation, assemblage et bourgeonnement

Cette étape conduit à l'expression de nouvelles particules virales et dépendent du type et de l'état de la cellule. La synthèse des protéines virales se fait à partir des ARNm viraux. L'assemblage des polyprotéines virales et l'encapsidation de l'ARN viral conduisent à la maturation des protéines virales, et à la formation de nouvelles particules virales qui bourgeonnent à la surface de la cellule avant d'être libérées dans le milieu extracellulaire, prêtes à infecter une nouvelle cellule cible [16,17].

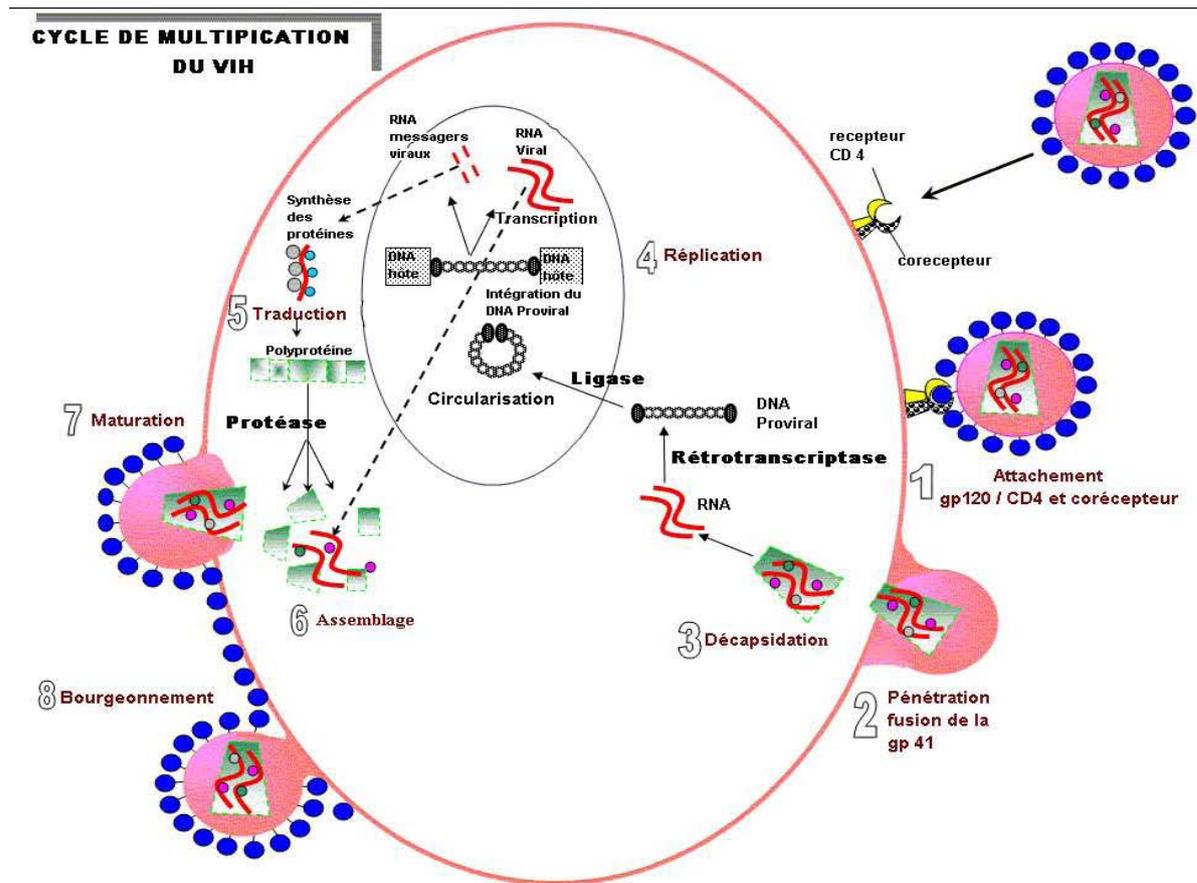


Figure 2 : Cycle de réplication du VIH [20]

3.5- Immunologie

Le VIH induit chez l'hôte récepteur des réponses immunes spécifiques qui ne contrôlent l'infection que de façon partielle. L'extrême variabilité du virus chez un même individu impose au système immunitaire une réadaptation constante [24]. Les deux types de réponses immunitaires (humorale et cellulaire) sont développés au cours de l'infection à VIH.

3.5.1-La réponse humorale

Elle est représentée par la production d'anticorps, et ceci très tôt après la contamination, dirigés contre toutes les protéines du VIH (anticorps anti-gp120

et anti-gp41). Cependant cette réponse humorale est dotée d'une pauvre activité neutralisante vis-à-vis des isolats de virus autologues. Ces observations suggèrent donc que cette réponse anticorps ne semble pas jouer un rôle central dans la maîtrise de la réplication virale. Ces anticorps sont la preuve de l'infection par le VIH; ils ont surtout un intérêt diagnostique et sont détectés par des tests sérologiques [24].

3.5.2-La réponse cellulaire

Elle est dominée par le rôle central que jouent les lymphocytes TCD8+ cytotoxiques (CTL) dans la maîtrise de la réplication virale. En effet, des CTL spécifiques du VIH-1 ont été retrouvés dans les lymphocytes de sang périphérique, des lymphocytes de lavage broncho alvéolaire, des ganglions, de la rate, de la peau, du LCR et des tissus de la muqueuse vaginale chez les personnes infectées. La réplication du VIH dans les lymphocytes TCD4+ peut être inhibée par des CTL autologues par des mécanismes incluant probablement la lyse cellulaire et la libération de chimiokines et de cytokines. La diminution de la charge virale associée à la latence clinique observée au cours de l'infection correspond de manière temporaire au développement d'une réponse lymphocytaire T cytotoxique spécifique [24].

3.6-Evolution immuno-virologique de l'infection à VIH

L'évolution naturelle de l'infection à VIH chez une personne infectée se fait en trois phases [fig.3]: la primo-infection, la phase chronique et la phase terminale.

3.6.1-La primo-infection

Cette phase dure en moyenne six semaines, débute avec le contage et se termine avec l'apparition d'anticorps anti-VIH qui marquent la séroconversion. Elle peut être asymptomatique ou se traduire, chez 50 à 70% des personnes infectées, par diverses manifestations cliniques transitoires. Cette phase est caractérisée par une réplication virale qui se traduit par une antigénémie positive dans le sang circulant et au niveau du LCR (liquide céphalo-rachidien) et traduirait l'établissement de sites privilégiés de la réplication virale à partir desquels a lieu la dissémination virale pendant tout le cours de l'infection [25, 26].

Chez les personnes en phase de primo-infection, environ la moitié des virus isolés a généralement un phénotype X4 ou CXCR4. La fin de cette phase de primo-infection est marquée, d'après les travaux de Daar et collaborateurs, par une diminution rapide de la charge virale circulante et un changement phénotypique des virus isolés qui sont majoritairement R5 circulante [27].

Du point de vue immunologique, cette phase se caractérise par une diminution transitoire du nombre de lymphocytes TCD4+ circulants et l'apparition de la réponse immune à médiation cellulaire [28]. L'apparition de la réponse immune humorale marque la fin de la phase et l'entrée dans la phase de chronicité.

3.6.2-La phase chronique

Elle fait suite à la primo-infection. Elle est asymptomatique et de durée variable : en moyenne une dizaine d'années en l'absence de tout acte thérapeutique.

La latence clinique observée pendant cette phase n'est pas synonyme de latence virologique car la faible charge virale observée pendant cette période est en fait la résultante entre la production et l'élimination des particules virales [26].

D'après Hayne et collaborateurs, la plupart des réponses immunes humorales et cellulaires mises en place pendant ou peu après la primo-infection, se maintiennent pendant toute la durée de la phase chronique [26].

3.6.3-La phase terminale

A la différence de la secondaire, la phase terminale est marquée par l'apparition de symptômes et constitue la phase SIDA proprement dite. Elle se caractérise par une lympho-adénopathie persistante et généralisée ainsi que par l'apparition de pathologies opportunistes au stade C de la maladie suivant les classifications du CDC. Elle dure en moyenne deux à trois ans et conduit, en l'absence de tout traitement, au décès du patient.

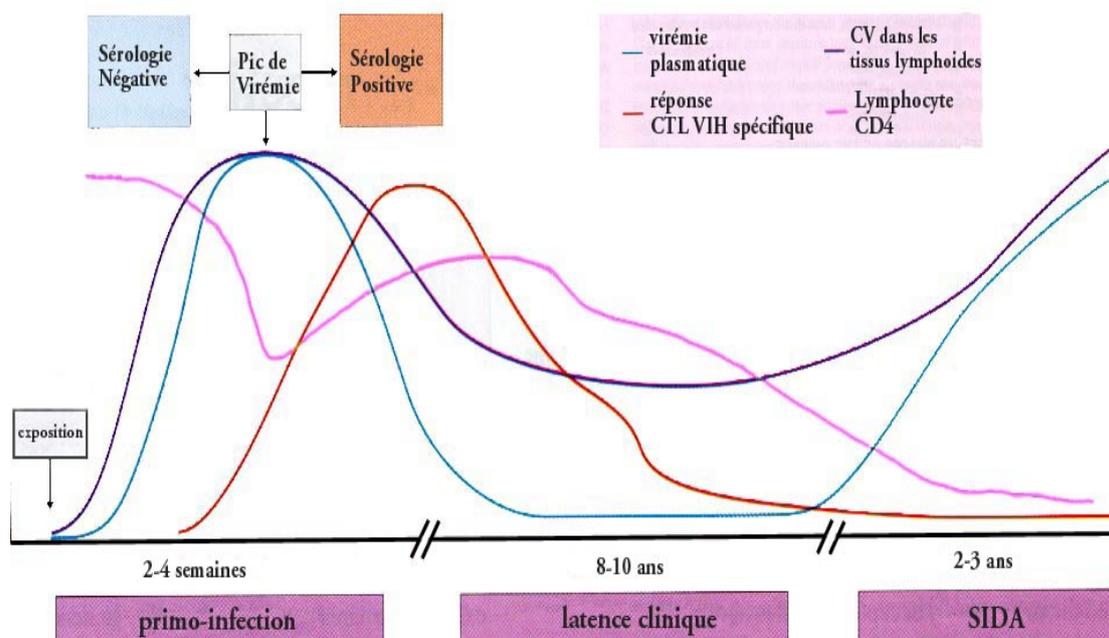


Figure 3 : Histoire naturelle de la maladie [54]

3.7- Histoire naturelle de l'infection à VIH chez l'enfant

Le système immunitaire de l'enfant étant immature à la naissance, se développant au cours du temps, la réponse immunitaire face à une contamination par le VIH est par conséquent moins efficace que chez l'adulte. L'évolution de l'infection à VIH chez l'enfant est bimodale en l'absence de traitement. 10 à 15% des enfants infectés présentent une forme évolutive précoce et sévère. Tandis que les autres ont un profil évolutif semblable à celui de l'adulte, avec un risque cumulatif de SIDA de l'ordre de 3% par an en l'absence de traitement.

3.7.1- Formes précocement sévères

Ces formes sont une spécificité pédiatrique. Les premiers signes apparaissent avant 3 mois et le stade SIDA entre 3 et 15 mois. On retrouve très souvent une hépato splénomégalie à la naissance, des adénopathies, une hypotrophie. Les infections opportunistes (muguet, candidose œsophagienne, pneumocystose pulmonaire...) surviennent rapidement avec une lymphopénie CD4 sévère. Une encéphalopathie est présente dans 70 à 80%. En l'absence de traitement antirétroviral, 90% de ces enfants décèdent avant 5 ans. Mais sous multi thérapie, l'évolution de ces formes est moins grave.

Les facteurs prédictifs sont entre autre : PCR positif à la naissance, profil immunitaire de dysfonction thymique, profil génétique de l'enfant (protection de la mutation CCR5 32), moment de la contamination (in utero+++), maladie de la mère (SIDA à l'accouchement, charge virale élevée, CD4 bas), maladie de l'enfant (révélation de la maladie avant 4 mois, SIDA

symptomatique, CV élevée, CD4 bas et diminuant rapidement), caractéristiques du virus (VIH1 plus virulent), co-transmission d'autres micro-organismes (CMV, toxoplasmose, Epstein Barr virus).

3.7.2 Formes lentement évolutives (85-90%)

L'histoire naturelle du VIH chez ces enfants est comparable à celle de l'adulte mais le syndrome clinique complet de primo-infection comme chez l'adulte est peu observé chez le nourrisson. Ainsi on retrouve une longue période asymptomatique en dehors des adénopathies. La symptomatologie la plus couramment rencontrée est représentée par les infections bactériennes récidivantes, les parotidites récurrentes, la pneumopathie interstitielle lymphoïde (PIL), les troubles de comportement, le retard cognitif, la dénutrition, le retard staturo-pondéral (observés uniquement en cas de déficit profond en CD4). La période de latence et la dégradation immunologique vont de 2 à 10 ans. Chez ces enfants, la survie à 3 ans est de 90%, à 8 ans de 80-90%, encore plus avec les multi thérapies.

Une bonne connaissance de la cinétique des anticorps et de l'antigène p24 est indispensable à l'interprétation des tests VIH. La *figure 3* résume les différentes situations. Après la contamination, le virus est détectable, sous sa forme d'acide ribonucléique (ARN) dès le 10-12^e jour et sous sa forme d'antigène p24 représentant juste une fraction du virus, vers le 12-14^e jour. Les premiers anticorps sont détectables vers le 21^e jour. Cette cinétique peut varier en fonction de chaque patient et aussi de la souche infectante. La positivité des tests de dépistage dépend donc de l'apparition des anticorps.

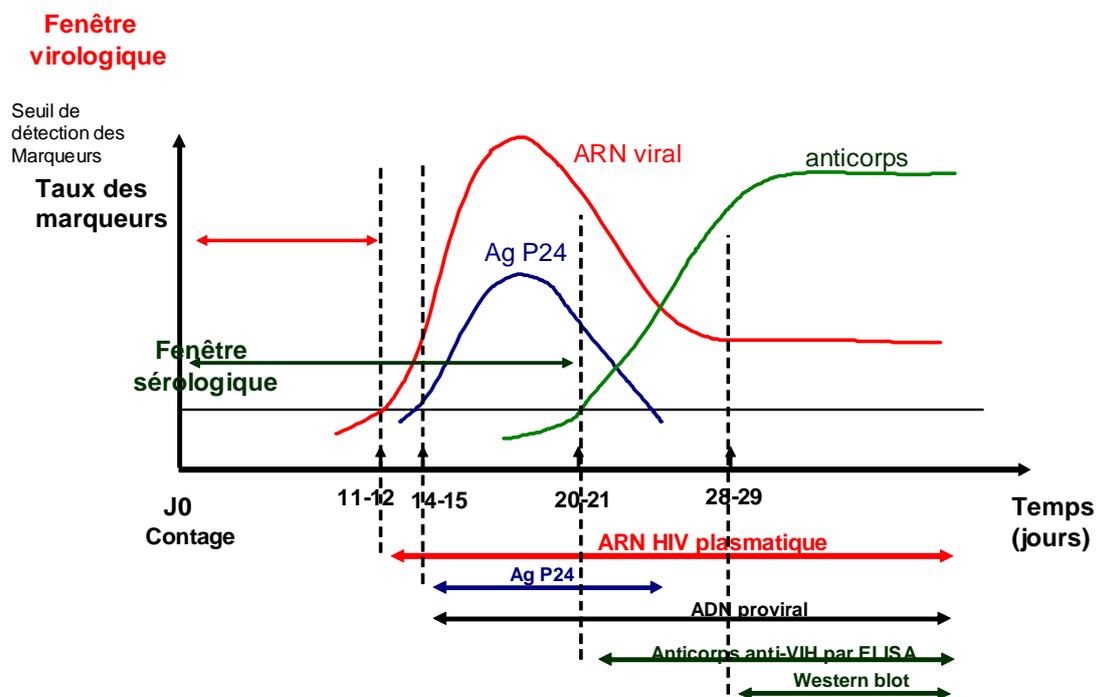


Figure 4 : Evolution des marqueurs immunologiques et virologiques [10]

IV-DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE L'INFECTION PAR LE VIH-1

Dans la majorité des cas, le diagnostic de l'infection à VIH chez l'adulte repose sur la détection des anticorps.

Chez l'enfant, né de mère séropositive, le diagnostic fait appel à des techniques moléculaires de détection du virus ou de son Ag p24.

4.1- Diagnostic direct

4.1.1-Détection de l'antigène p24

Les antigènes viraux circulants correspondent aux particules virales et aux protéines virales libres. Les méthodes ELISA commercialisées détectent essentiellement la protéine p24 du VIH-1 [22]. La positivité de la réaction doit être confirmée par un test de neutralisation qui inhibe spécifiquement la détection de l'antigène et permet d'exclure ainsi un éventuel faux positif.

La recherche de l'antigène p24 dans le sérum est aujourd'hui pratiquée en cas de suspicion de primo infection lorsque les anticorps ne sont pas encore apparus.

4.1.2-Isolement du VIH en culture cellulaire

L'isolement viral se fait à partir des cellules mononuclées sanguines ou du plasma du sujet infecté grâce à l'adjonction de cellules mononuclées de donneurs sains qui servent de support pour la multiplication virale.

Une variante particulière est fondée sur la purification des cellules CD4+ du sujet infecté et leur activation avant coculture.

Dans tous les cas, la multiplication virale est détectée par l'apparition de l'antigène p24 et/ou d'une activité enzymatique de transcription inverse dans le milieu de culture.

Des techniques ELISA permettent la mise en évidence de l'antigène p24 dans les cultures positives au VIH-1[23].

Le VIH-2 peut être isolé par une procédure identique.

La culture cellulaire est une méthode longue, coûteuse, nécessitant des laboratoires spécialisés [30].

4.1.3-Détection des acides nucléiques viraux

La biologie moléculaire est une discipline scientifique dont l'objet est la compréhension des mécanismes de fonctionnement de la cellule au niveau moléculaire. Le terme « biologie moléculaire » désigne également l'ensemble des techniques de manipulation d'acides nucléiques (ADN, ARN), appelées aussi techniques de génie génétique.

La biologie moléculaire est apparue au XXe siècle, à la suite de l'élaboration des lois de la génétique, la découverte des chromosomes et l'identification de l'ADN comme support chimique de l'information génétique.

Il existe actuellement de nombreuses techniques propres à la biologie moléculaire. Seule la PCR qui est la technique utilisée pour notre étude sera évoquée.

4.1.3.1- La technique de la PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction, en Français réaction de polymérisation en chaîne) a été mise au point par Kary Mullis et a certainement connu le développement le plus spectaculaire et le plus rapide de l'histoire de la Biologie Moléculaire [31, 32,33].

Il s'agit d'une amplification élective d'une séquence d'ADN double brin, effectué in vitro par extension itérative de deux amorces situées de part et d'autre de la région considérée grâce à une polymérase [22]. Cette réaction est répétée plusieurs fois constituant des cycles PCR en vue d'amplifier le signal obtenu. De façon pratique, en plus de l'ADN, les réactifs nécessaires pour réaliser la PCR sont :

- Les deux amorces sens et anti-sens encadrant la région à amplifier,
- Les quatre désoxynucléotides triphosphate ou DNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) en large excès molaire,
- L'ADN polymérase,
- Et certains ions dont le Mg^{2+} .

Un cycle de PCR est la répétition de trois étapes thermiques réalisées successivement dans le même tube : une étape de dénaturation des acides nucléiques, une étape d'hybridation des amorces sur les séquences cibles et une étape d'extension des amorces par l'ADN polymérase.

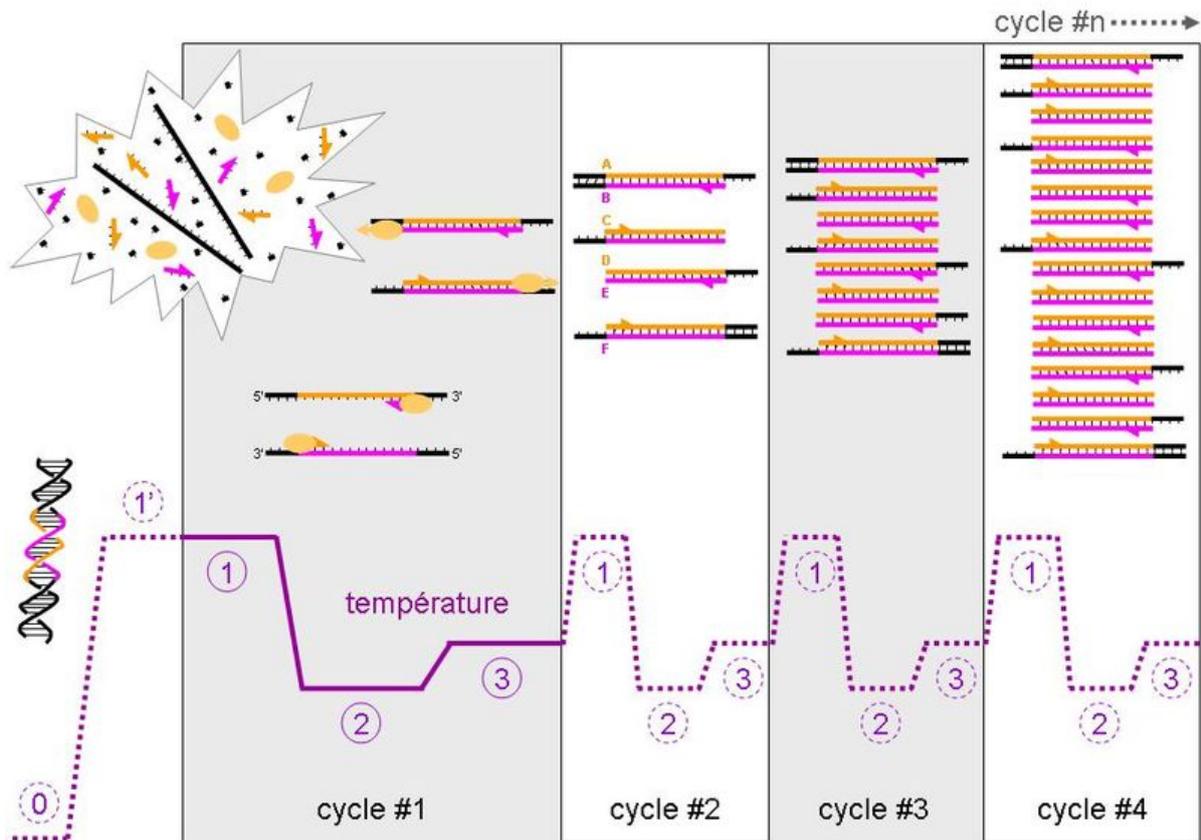


Figure 5 : Etapes d'un cycle de PCR

- Etape de dénaturation : (1 sur le schéma)

Les deux brins complémentaires de l'ADN sont maintenus appariés par des liaisons non covalentes établies entre les bases. L'étape de dénaturation correspond à la rupture de ces liaisons à haute température (94°C) séparant alors les deux brins d'ADN.

- Etape d'hybridation :(2 sur le schéma)

En se plaçant dans des conditions de renaturation de l'ADN par diminution progressive de la température (à 55°C), les amorces oligonucléotidiques viennent s'hybrider sur leurs séquences complémentaires. En effet ces amorces sont de petits brins d'ADN environ de 20 bases capables de s'hybrider de façon spécifique grâce à la complémentarité des bases sur le brin d'ADN ou sur son brin complémentaire. Cette étape d'hybridation est pratiquement instantanée et dure une minute. La spécificité de la PCR repose sur la qualité de cette hybridation amorce/séquence cible

Etape d'extension ou d'élongation : (3 sur le schéma)

Au cours du premier cycle, les amorces ainsi hybridées servent d'amorce à une polymérase qui va recopier chacun des deux brins initiaux. L'enzyme utilisée est une ADN polymérase thermorésistante appelée Taq polymérase (Taq pol) extraite d'une archaebactérie (*Thermus aquaticus*). Sa température optimale d'action est de 72°C mais elle est capable de résister à des passages successifs à 95°C [43, 45]. A partir de l'amorce, les DNTP présents en large excès dans le milieu sont ajoutés successivement par la Taq polymérase au brin d'ADN en extension. Le brin néosynthétisé s'allonge dans le sens 5'→3'. Chaque nouvelle base mise en place étant complémentaire de la base correspondante de la matrice. On assiste donc à la synthèse d'une séquence exactement complémentaire de la base correspondante de la matrice. Ces trois étapes constituent un cycle d'amplification, mais environ 30 à 40 cycles constituent une réaction de PCR [34]. Ces cycles s'effectuant en chaîne dans un appareil appelé « thermocycleur ». Le thermocycleur (aussi appelé cycleur thermique ou machine PCR) est un appareil automatisant la réaction de PCR "classique" ou "point final". L'appareil est muni d'un *bloc thermique* ("thermal

block") avec des trous où l'on peut insérer les tubes contenant le mélange réactionnel de la PCR.

Le thermocycleur est un « bain-marie sec » ou « bloc chauffant » capable de modifier sa température suivant un programme préétabli correspondant aux étapes de transcription inverse, dénaturation, hybridation, et élongation. Au fil des cycles, la quantité d'amplicons va augmenter de façon exponentielle. On obtient en théorie 2^n copies pour n cycles [34, 35,36], mais en pratique cela dépend du rendement réel de la technique.

La cinétique de la réaction PCR met en jeu trois phases : une phase d'initiation, une phase exponentielle qui correspond à l'accumulation exponentielle des produits amplifiés et une troisième phase plateau entre 30 et 40 cycles reflétant d'une baisse de l'efficacité d'amplification qui résulte en partie de l'inactivation thermique partielle de l'ADN polymérase au cours des derniers cycles et du fait que les produits nécessaires à l'amplification (DNTP et amorces) deviennent limitant.

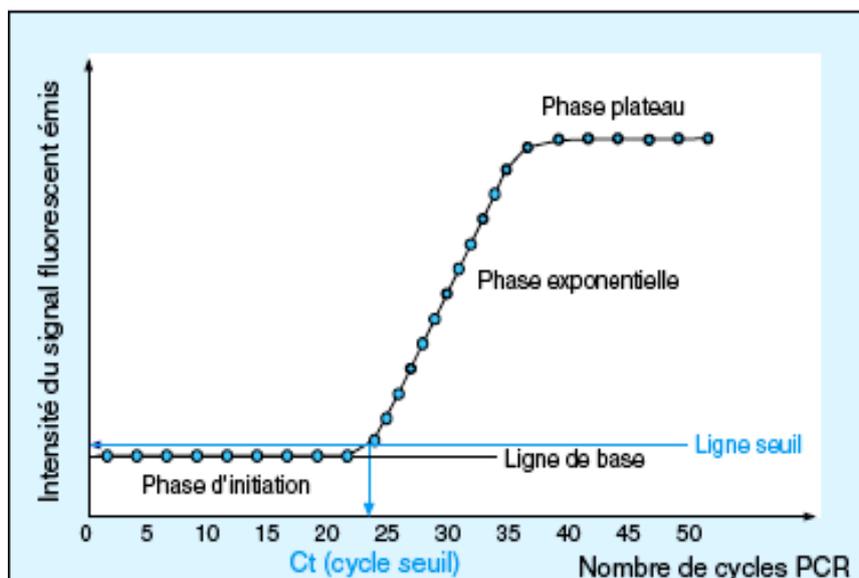


Figure 6 : Cinétique de la réaction de PCR [35]

Le point d'intersection de la courbe avec la ligne seuil définit le cycle seuil ou cycle threshold (Ct) qui est le départ de la phase exponentielle et qui se trouve directement lié à la quantité de cible initialement présente dans l'échantillon [36,37]. En outre il existe de nombreuses variantes de la PCR dont la PCR en temps réel que nous utiliserons dans notre travail.

4.1.3.2-La PCR en temps réel

➤ Principe de la PCR en temps réel

La PCR quantitative en temps réel repose pratiquement sur le même principe que la PCR classique en ce qui concerne l'amplification génique. La différence se trouve au niveau de la détection ou elle nécessite en plus des deux amorces une autre sonde de détection ou un agent intercalant. La détection et l'amplification se font de manière simultanée par la détection de la fluorescence engendrée pendant l'amplification grâce au système de détection intégré. Cela permet de suivre la PCR cycle par cycle par le biais d'une station informatique couplée à l'appareillage. La détection de la fluorescence utilise des technologies variées selon les systèmes de détection mis en place [35, 36].

➤ Systèmes de détection en temps réel

Les systèmes permettant la détection des molécules d'amplification générées après chaque cycle font appel soit à un agent intercalant soit à une sonde fluorogénique [36].

- *Chimie des agents intercalant :*

On distingue deux types d'agents intercalant utilisés pour la détection qui sont le bromure d'éthidium (BET) et le SYBR Green fabriqué par « Molecular Probe ».

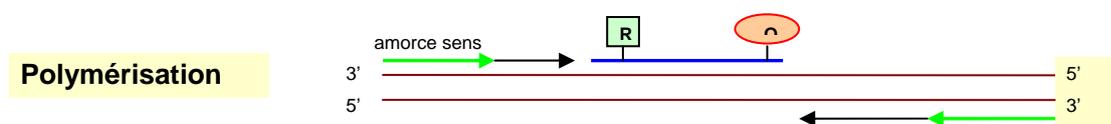
Ce dernier qui est le plus utilisé des intercalant se lie préférentiellement à l'ADN double brin nouvellement synthétisé. A chaque étape d'hybridation et d'élongation d'un cycle de PCR, il s'intercale entre les bases nucléotidiques de l'ADN double brin et peut émettre un signal de fluorescence lorsqu'il est excité par des rayonnements ultraviolets. La mesure de l'intensité du signal émis à la fin de chaque étape d'élongation permet le suivi cycle par cycle de la réaction PCR.

- *Chimie des sondes fluorogéniques :*

Plusieurs types de sondes peuvent être utilisés :

- *Les sondes d'hydrolyse ou sondes TaqMan*

La sonde TaqMan est un fragment oligonucléotidique marqué par deux groupements fluorophores à ses extrémités 5' (Reporter : R) et 3' (Quencher : Q). De par sa proximité, le Quencher absorbe la fluorescence du Reporter. Au cours de la polymérisation, l'activité 5'--- 3' de la Taq polymérase dégrade la sonde TaqMan. Le Reporter n'étant plus attaché au Quencher, son émission de fluorescence est augmentée. La dégradation de la sonde est proportionnelle à l'augmentation de la fluorescence du Reporter et proportionnelle au nombre de copies effectuées au cycle.



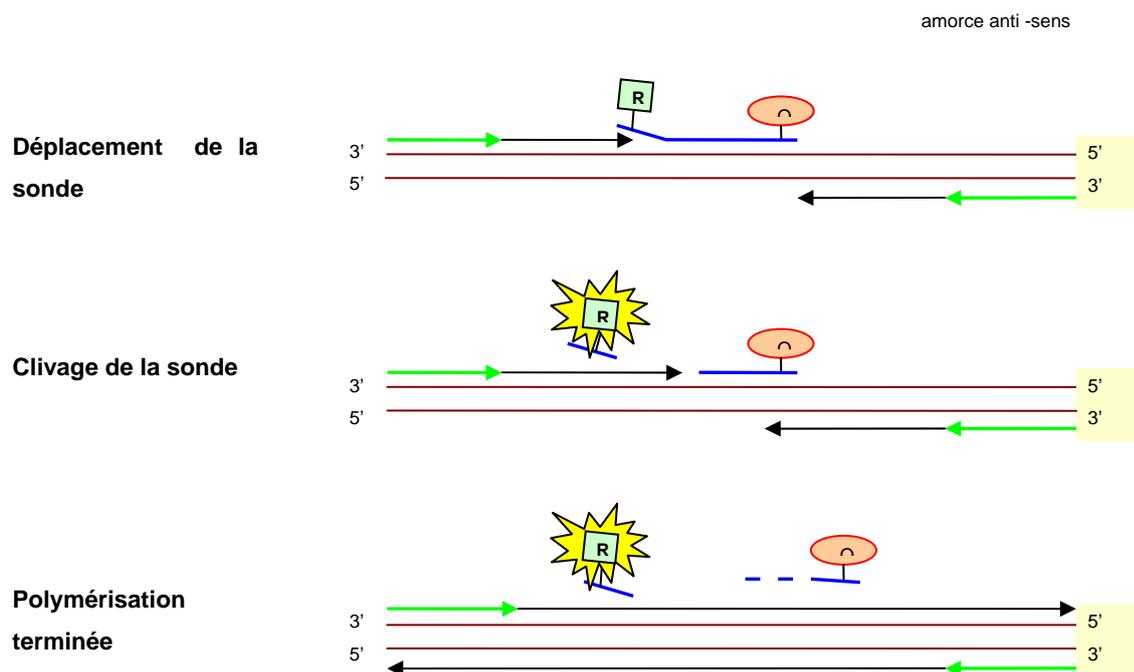


Figure 7 : Principe de la chimie TaqMan[54]

- *Les sondes FRET en tandem ou sonde Light Cycler :*

Les sondes FRET (Flouescence Resonance Energy Transfert) utilise un couple de sondes d'hybridation très courtes portant chacune un fluorophore.

- *Les sondes Beacon ou sondes d'hybridation phare :*

Ce sont des sondes d'hybridation en « épingle à cheveux » qui portent à leur extrémité 5' un groupement fluorophore (Reporter) et à l'extrémité 3' un groupement fluorophore non fluorescent (Quencher).

D'autres systèmes comme le système Scorpion, le système Amplifluor et le système des sondes peptidiques light-up ont été récemment développés.

➤ **Quantification en PCR en temps réel**

La PCR en temps réel repose sur un nouveau principe de quantification. En effet, si la quantité obtenue à la fin d'une PCR n'est pas toujours significative, seule la phase exponentielle est représentative du nombre de copies initiales. Ce moment correspond à un certain nombre de cycle appelé Ct (Threshold Cycle ou cycle seuil) qui est inversement proportionnelle au logarithme du nombre de copies de la séquence cible dans l'échantillon [6].

➤ **Avantage de la PCR en temps réel [6]**

De nombreux avantages sont reconnus à la PCR en temps réel par rapport à la PCR classique :

- L'avantage majeur de la PCR en temps réel est le gain de temps et la rapidité de sa mise en œuvre. On peut avoir 96 analyses en 1 à 2 heures.
- Le risque de contamination post PCR est quasi nul du fait que les tubes ne sont pas ouverts après amplification. Cependant les risques de contamination pré-PCR existent et sont les mêmes que pour la PCR en point final,
- La détermination des Ct est effectuée à la même intensité de fluorescence pendant la phase exponentielle, ce qui permet une précision identique pour une gamme dynamique de mesure,
- L'utilisation d'une sonde en plus des deux amorces augmente fortement la sensibilité de la technique et la spécificité des amplicons générés,
- Une bonne traçabilité car la détection, l'enregistrement et l'analyse sont intégrés grâce au logiciel de lecture installé,

- Le coût des réactifs est relativement peu élevé.

Les acides nucléiques ne peuvent être amplifiés qu'après avoir été extraits et purifiés à partir des cellules sanguines.

➤ **Méthodes d'extraction des acides nucléiques**

Toute méthode d'extraction des acides nucléiques comprend une étape préalable de lyse cellulaire et d'inactivation des nucléases permettant de libérer l'ARN ou l'ADN qui est mélangé à un ensemble de protéines [38].

- Lyse cellulaire et dénaturation des protéines

La lyse est réalisée dans des conditions dénaturantes pour « casser » les cellules. On procède à la dénaturation des protéines en utilisant une protéinase K ou une protéase. En outre, la plupart des agents dénaturants utilisés sont de puissants inhibiteurs des ribonucléases (RNases) ou des désoxyribonucléases (DNase). Les RNases ou DNases étant des enzymes qui dégradent l'ARN ou l'ADN et empêchent la réaction de polymérisation.

- Méthodes d'extraction des acides nucléiques

- *Extraction basée sur les différences de propriétés physicochimiques*

On distingue d'une part la méthode utilisant la différence de solubilité des acides nucléiques et des protéines dans les solvants polaires (phénol, chloroforme, isopropanol) et d'autre part la méthode utilisant le gradient de densité au chlorure de césium (CsCl) qui permet de séparer les acides nucléiques et les protéines en fonction de leurs densités relatives. Cette

dernière méthode est considérée comme méthode de référence mais très coûteuse [41].

- *Extraction basée sur les différences d'adsorption sur support solide*

Cette méthode est basée sur la propriété qu'ont les particules de silice d'adsorber les acides nucléiques en présence de sels chaotropiques (iodure de sodium (NaI), thiocyanate de guanidine, hydrochlorhydrate de guanidine). Les particules de silice sont disposées en colonne, sur filtre ou recouvrant des billes aimantées. La séparation est opérée par centrifugation ou tri magnétique après lavage éliminant les inhibiteurs, les sels et les résidus d'éthanol.

L'élution est réalisée à l'aide d'une solution aqueuse alcaline très peu saline exempte de ribonucléases ou de désoxyribonucléases.

Bien que les procédés d'extractions se soient simplifiés et que de nombreux réactifs prêts à l'emploi soient disponibles, l'extraction des acides nucléiques est très consommatrice de temps et nécessite de nombreuses manipulations. Elle fait appel à des étapes d'incubation, de centrifugation ou de filtration.

➤ **Conditions de la pratique de la PCR**

La mise en évidence et la quantification des acides nucléiques viraux font appel à des techniques variés mais ayant en commun des exigences dans leur réalisation. Ces exigences sont observées à tous les niveaux de l'analyse et sont le gage d'obtention de résultats fiables.

- Prélèvement

Le prélèvement doit être le plus stérile possible. Il est effectué à l'aide de système de prélèvement sous vide de préférence ou à l'aide d'une seringue

stérile au cas échéant sans ouvrir le tube pour éviter l'introduction de particules. Pour les mesures sur le plasma, les tubes utilisés doivent contenir un anti coagulant tel que l'EDTA (Ethylène Diamine Tétra Acétique) ou le citrate tri sodique mais jamais l'héparine qui inhibe les polymérase [6, 36, 39].

- *Locaux et matériel requis pour la pratique de la technique RT-PCR*

Les manipulations doivent être réalisées dans des locaux spécialement dédiés à chacune des étapes de la technique. On distingue en général 3 compartiments dénommés zone 1 ou zone de pré-amplification, pièce intermédiaire ou antichambre et zone 2 ou zone d'amplification et de détection.

- **Zone 1 ou zone de pré-amplification**

Elle peut être subdivisée en 2 secteurs : l'un pour la préparation des réactifs d'extraction et l'autre pour l'extraction des acides nucléiques et l'ajout du mix d'amplification. Des réfrigérateurs et congélateurs pour la conservation des réactifs doivent y être spécialement réservés et les manipulations dans cette zone doivent être effectuées sous des hottes à flux laminaire dont la contamination est régulièrement contrôlée.

Les centrifugeuses utilisées doivent être munies d'un rotor protégé et les incubateurs doivent être des bains secs chauffants.

- **Pièce intermédiaire**

Elle permet de changer de blouse et de gants lorsqu'on passe de la zone 1 à la zone 2.

- **Zone 2 ou zone d'amplification et de détection**

Cette zone est réservée à l'amplification et à la détection des produits amplifiés. Les réfrigérateurs et congélateurs y sont également dédiés.

En outre, le sens de circulation de la zone 1 vers la zone 2 doit être strictement respecté pour éviter toute contamination. Pour aller de la zone 1 à la zone 2 on passe par la pièce intermédiaire mais on ne peut revenir à la zone 1 par le même chemin.

➤ **Réactifs et consommables nécessaires**

Les réactifs doivent être préparés et stockés uniquement dans le secteur correspondant. Les réactifs d'amplification doivent être conditionnés en petite quantité (au préalable) pour ne pas avoir à pipeter et à congeler/décongeler plusieurs fois car risque de dégradation et de contamination des réactifs. Les réactifs utilisés doivent être issus du même lot et ne doivent pas être périmés. Les pipettes utilisées doivent aussi être dédiées à chaque secteur correspondant et jamais interchangeable. Elles doivent être calibrées et très précises. Les embouts utilisés pour pipeter doivent être munis d'un filtre.

Les gants de protection doivent être sans talc car le talc augmente les risques de contamination.

Il est recommandé d'utiliser des tubes à bouchons à vis avec joint tonique non générateur d'aérosols à l'ouverture.

Tout le matériel utilisé tel que les pipettes, les portoirs, les embouts, les poubelles, les marqueurs, etc. doivent être décontaminés à la lampe ultra violet (UV) avant et après les manipulations.

➤ **Précautions et exigences concernant la manipulation**

En plus des exigences concernant les locaux, le matériel et les réactifs d'un laboratoire de BM d'autres précautions importantes sur la manipulation proprement dite garantissent l'obtention de résultats fiables. Ce sont :

Il faut toujours travailler sous un PSM (Poste de Sécurité Moléculaire), en ouvrant les tubes les uns après les autres et un seul tube à la fois, et le refermer au fur et à mesure pour éviter les contaminations croisées. L'embout utilisé après chaque pipetage doit être jeté aussitôt dans la poubelle. Il faut travailler impérativement avec des gants, les changer régulièrement entre les étapes et à chaque fois qu'ils sont souillés. Les règles d'habillement en changeant de blouse entre les deux zones doivent être respectées. Les surfaces de travail et le matériel doivent être décontaminés par une solution d'hypochlorite de sodium (eau de javel) diluée, de l'eau distillée et de l'éthanol. En effet, l'eau de javel étant susceptible d'endommager l'appareillage et les parties métalliques, il convient d'utiliser une quantité suffisante d'éthanol jusqu'à ce que les restes d'eau de javel disparaissent.

➤ **Limites de la technique**

Les principales limites de la mesure par PCR sont l'existence de faux positifs et de faux négatifs dus à diverses raisons :

- Les faux négatifs dérivent d'une part de l'apparition de mutations dans les séquences cibles conduisant à des amorces non adaptées à la cible et d'autre part de l'existence d'inhibiteurs des polymérase dans les échantillons,
- Les faux positifs eux dérivent de la contamination des échantillons analysés soit par les contrôles positifs, soit par les autres échantillons et

surtout soit par les produits amplifiés. C'est le caractère d'extrême sensibilité de la PCR.

Seule l'observation de conditions de travail rigoureuses permettent de minimiser les risques de faux positifs [39, 40].

Autre limite de la PCR est celle du nombre de copie de la cible. Lorsque le nombre de copie de départ est faible, il est préférable d'effectuer deux PCR successives plutôt que de multiplier le nombre de cycle. En effet après 40 à 50 cycles la quantité d'ADN ne change plus, le plateau est atteint ; cela constitue une autre limite intrinsèque de la PCR [33].

4.2-Diagnostic indirect

Le diagnostic indirect ou sérologique de l'infection à VIH repose sur l'utilisation de deux types de tests : les tests de dépistage qui ont l'avantage d'être extrêmement sensibles et des tests de confirmation beaucoup plus spécifiques.

4.2.1-Les tests de dépistage

➤ Les tests ELISA

Les méthodes immuno-enzymatiques de type ELISA sont actuellement les méthodes de référence pour mettre en évidence les anticorps sériques du sujet infecté [20].

Les antigènes utilisés pour ces tests étaient initialement des lysats de cellules infectées par le VIH. Actuellement, la majorité des tests utilisent des protéines recombinantes produites par génie génétique ou des peptides

synthétiques. Les antigènes doivent être les plus représentatifs possibles de l'ensemble des virus en circulation.

Les tests homologués permettent de détecter des anticorps contre les divers VIH-1 du groupe M et du groupe O, ainsi que contre les différents sous-types de VIH-2.

Les tests actuels sont sensibles et spécifiques; ils permettent la détection des primo-infections, révélant la présence d'anticorps en moyenne 22 jours après la date présumée du contagage [20].

➤ **Les tests rapides**

Ces tests font appel à une agglutination ou à une adsorption du complexe antigène-anticorps (Ag-Ac) sur une membrane, suivie d'une coloration visible à l'œil nu. Ils peuvent être faits en moins de 30 minutes, sans appareillage sophistiqué, et sont capables de dépister les anticorps anti VIH-1 et anti VIH-2.

Ces tests sont souvent utilisés dans les pays en voie de développement à cause de leur simplicité et la rapidité du résultat qui facilitent l'accès aux soins.

Tous les tests de dépistage comportent le risque de résultats faussement positifs, risque qui persiste en dépit des progrès les plus récents. Cette limite impose en cas de positivité ou de discordance, le recours à des tests de confirmation.

➤ **Les tests de confirmation**

La technique de référence est le Western Blot. Dans un premier temps, les protéines virales sont séparées selon leur masse moléculaire par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide et en milieu dissociant, puis transférées sur membranes de nitrocellulose ; cette dernière est ensuite découpée en bandes longues et étroites. Dans un second temps, les sérums à

tester sont mis à incuber en présence des bandelettes de nitrocellulose ; les anticorps présents se fixent en fonction de leur spécificité sur les protéines virales préalablement séparées ; on révèle leur présence par addition d'une anti globuline humaine marquée par une enzyme, puis d'un substrat chromogène [32, 41].

Cette méthode longue et coûteuse est aujourd'hui d'utilisation aisée dans les laboratoires grâce à la commercialisation de bandelettes prêtes à l'emploi, qui épargnent à l'utilisateur les étapes délicates de la préparation de l'antigène de l'électrophorèse et du transfert.

La présence d'anticorps anti-protéines constitutives du virus dans les échantillons étudiés se traduit par l'apparition de bandes spécifiques colorées dont la position correspond aux masses moléculaires des protéines majeures du virus. Les bandes doivent être retrouvées dans des positions identiques à celle observées sur les indispensables bandelettes témoins et doivent être interprétées avec précaution et selon certains critères bien établis.

V-DIAGNOSTIC DE L'INFECTION PAR LE VIH CHEZ L'ENFANT DE MOINS DE 18 MOIS

Le risque de transmission du virus de la mère à l'enfant est lié au taux de virus maternel et au risque de transmission virale par micro-transfusions en fin de grossesse ou par contamination de l'enfant lors du passage dans la filière génitale. En l'absence de traitement le risque de transmission du virus à l'enfant est de l'ordre de 20%, il est réduit à moins de 1% en cas de traitement antirétroviral préventif administré à la mère et dans les premières semaines de vie du nouveau-né. Le diagnostic de l'infection à VIH chez un enfant né de mère séropositive se fait différemment selon l'âge auquel sont effectués les prélèvements sanguins [42].

Diagnostic de l'infection à VIH-1 chez le nouveau-né: le diagnostic utilise les techniques de détection du virus puisque la présence d'anticorps maternels empêche toute approche sérologique jusqu'à l'âge de 16-18 mois. La recherche du virus peut se faire par PCR-ADN à partir des cellules sanguines pour la recherche de génome viral intégré ou par détection de l'ARN-VIH plasmatique avec les techniques habituellement utilisées pour le suivi de patients séropositifs. La recherche de virus par culture reste intéressante en cas de virus atypique ou variant non reconnu par les techniques moléculaires. Il s'agit le plus souvent d'infections survenant chez des femmes d'origine africaine; pour faciliter le diagnostic chez le nouveau-né, il est parfois nécessaire d'adresser un prélèvement maternel en cours de grossesse au laboratoire de virologie qui réalisera le diagnostic, afin qu'il puisse sélectionner les techniques adaptées au virus maternel avant de les appliquer aux échantillons de l'enfant (exemple: infection par un virus VIH-1 du groupe O).

En l'absence de traitement de l'enfant, les sensibilités des deux techniques de PCR-ADN et ARN-VIH plasmatique sont équivalentes. Pour poser le diagnostic d'infection il est nécessaire d'avoir deux prélèvements positifs, cela quelle que soit la technique utilisée. Inversement pour poser un diagnostic de non-infection, il faut deux prélèvements négatifs [42].

En cas de traitement préventif de la transmission virale, le diagnostic est peu fiable tant que l'enfant est sous traitement antirétroviral. Il faut donc deux prélèvements négatifs hors période de traitement pour considérer un enfant comme non infecté. Les prélèvements précoces, naissance et premières semaines de vie, peuvent être informatifs en cas de résultat positif, ils permettent notamment d'affirmer une infection in utero en cas de positivité dès la naissance [42].

En cas d'allaitement maternel, il est nécessaire de rechercher l'infection dans les trois mois qui suivent l'arrêt définitif de l'allaitement [42]. Cette situation peut se rencontrer chez des nourrissons d'origine africaine.

En cas d'infection à VIH-2, seules les techniques de PCR-ADN utilisant des amorces spécifiques de VIH-2 sont à privilégier, du fait que la technique de mesure de l'ARN-VIH-2 plasmatique n'a pas été évaluée dans le contexte du diagnostic de l'enfant [42]. Les mêmes règles de prescription que celles décrites pour VIH-1, en soulignant la nécessité des deux prélèvements négatifs pour affirmer une non infection et celle de deux prélèvements positifs pour un diagnostic d'infection [42].

Diagnostic de l'infection à VIH au-delà de l'âge de 18 mois: les techniques sérologiques permettent de détecter la réponse anticorps de l'enfant, elles peuvent être utilisées selon le même algorithme que celui utilisé pour le diagnostic de l'infection de l'adulte.

DEUXIEME PARTIE :

NOTRE ETUDE

OBJECTIFS DE L'ETUDE

I-LES OBJECTIFS DE L'ETUDE

1-1-Objectif Général

Evaluer la performance de la technique de PCR ADN sur papier filtre dans le diagnostic précoce du VIH-1 chez les enfants de moins de 18 mois nés de mère infectée.

1-2-Objectifs Spécifiques

1. Décrire les caractéristiques sociodémographiques des enfants de moins de 18 mois de notre étude.

2. Déterminer le statut sérologique en fonction des tranches d'âge des enfants de notre étude.
3. Déterminer la fréquence des enfants de moins de 18 mois dont la PCR-ADN et la PCR-ARN sont positives.
4. Comparer les techniques de PCR-ARN plasmatiques et PCR-ADN sur DBS.

METHODOLOGIE

II-METHODOLOGIE

2-1-Type et période d'étude

Il s'agit d'une étude prospective expérimentale qui s'est déroulée de Mai 2009 à Février 2010.

2-2-Cadre de l'étude

L'étude s'est déroulée au laboratoire de biologie moléculaire de Centre Hospitalier Universitaire Pédiatrique Charles DE GAULLE (CHUP-CDG). Le CHUP-CDG est situé au secteur 28 de Ouagadougou, au croisement de l'avenue Charles DE GAULLE et du boulevard des Tensoaba. Il compte un laboratoire en son sein qui est composé de plusieurs sections : Bactériologie, Parasitologie, Biochimie, Hématologie, Immuno-Sérologie, Biologie Moléculaire.

La section de biologie moléculaire comprend deux salles de travail distinctes : l'une au sein même du laboratoire, c'est la salle où sont effectuées l'extraction et l'amplification des acides nucléiques ; et l'autre située hors du laboratoire, c'est la salle de préparation des mix (mélange réactionnel intervenant dans l'amplification). Avant d'entrer dans cette salle, il y a une petite pièce servant de lieu pour changer de blouse : c'est une salle intermédiaire. L'on ne rentre jamais dans la salle des mix avec du matériel ou une blouse provenant de la salle d'extraction, ceci afin d'éviter tout risque de contamination qui pourrait inhiber la réaction d'amplification.

2-3-Population d'étude

Il s'agit de tout enfant de moins de 18 mois nés de mère infectée par le VIH-1.

2-4-Critères de la population d'étude

2-4-1-Critères d'inclusion

Enfants de moins de 18 mois sans distinction de sexe, nés de mère infectée par le VIH-1 et dont la mère est suivie par le programme PTME dont les prélèvements sont parvenus au laboratoire de biologie moléculaire du CHUP-CDG

2-4-2-Critères d'exclusion

Enfants âgés de plus de 18 mois nés de mère infectée.

Enfants de moins de 18 mois dont la mère est infectée par le VIH-2.

Enfants d moins de 18 mois dont la sérologie de la mère est inconnue.

2-5-Considérations éthiques

L'étude s'est déroulée dans la stricte confidentialité et les résultats obtenus ont été remis sous pli fermé aux responsables du programme demandeur de l'examen.

2-6-Variables d'étude

- Age,
- Sexe,
- résultats de la PCR-ADN,
- résultats de la PCR-ARN,
- Sérologie VIH-1.

2-7-Méthode d'échantillonnage

Les enfants nés de mère infectée ont été retenus pour notre étude à partir d'un échantillonnage non probabiliste (échantillonnage de commodité). La taille de l'échantillon était de 60.

2-8-Matériel

2-8-1-Matériel d'étude

Il s'agit du plasma obtenu après centrifugation du sang total recueilli sur tube EDTA et de goutte de sang total séché sur papier filtre (DBS).

2-8-2-Equipement, petit matériel et réactifs de laboratoire

➤ Equipement de laboratoire

Dans la salle d'extraction et d'amplification :

- hotte à flux laminaire vertical (Juan MSC12),
- micro centrifugeuse (Juan A 14),
- centrifugeuse mixte (Juan MS 23i),
- agitateur vortex (Electric Heidolph Reax Control),
- plaque chauffante (Lab.-Line Multi block),
- thermocycleur ABI 7000.

Dans la salle des mix :

- hotte à flux laminaire vertical Mini flux II (ESI FLURANCE),
- agitateur vortex (Heidolph électrique).



Figure 8 : Hotte à flux laminaire vertical Mini flux II (ESI FLURANCE)

➤ Petit matériel et consommable

Dans la salle d'extraction et d'amplification :

- des micropipettes calibrées Gilson de : 2-20 μL , 10-100 μL , 50-200 μL , 200-1000 μL ,
- des embouts de pipettes Gilson de : 5-100 μL , 30 μL , 100 μL
- un chronomètre,
- des microplaques de 96 puits (Abbott 96 Well Optical Reaction 4J71-70),
- des tubes eppendorf de 1,5mL,
- des tubes collecteurs de 2mL
- des portoirs,

- des gants sans talc,
- deux perceuses pour découper les DBS,
- des désinfectants,
- de papier essuie tout,

Dans la salle des mix :

- des micropipettes calibrées,
- des tubes eppendorf,
- des gants sans talc.

Matériel nécessaire à la confection des DBS :

- une carte de collecte de sang (papier buvard),
- des lancettes,
- du coton et de l'alcool éthylique à 70°,
- des sacs plastics scellables,
- des indicateurs d'humidité,
- des déssicants.

Réactifs utilisés pour la PCR-ADN :

- Le kit d'extraction Qiagen QI Amp DNA Minit kit 51304 qui comprend :
 - Protéinase K,

- Tampon ATL,
 - Tampon AL,
 - Tampon AW1,
 - Tampon AW2,
 - Tampon AE.
- L'éthanol absolu 96-100°,
 - L'eau qualité biologie moléculaire, distillée ultra pure, sans DNase, sans RNase,
 - Le kit d'amplification GENERIC DNA CELL TR002-500 composé :
 - du standard contenant de l'ADN à 3.10^6 copies/mL,
 - du contrôle interne de reproductibilité (CI),
 - du Mix q PCR avec Platinum Taq 60U /mL plus ROX,
 - de l'Amorce A,
 - de l'Amorce B,
 - de la Sonde C.

Pour la PCR ARN :

- Le kit d'extraction Qiagen QI Amp RNA Minit kit 52904 composé de :
 - Tampon AVE,
 - ARN carrier,
 - Tampon AVL,
 - Tampon AW1,
 - Tampon AW2.
- Ethanol absolu 96-100° (Carlo Erba 414607),
- Eau spéciale biologie moléculaire (Roche),

- Le kit d'amplification GENERIC HIV Charge virale Biocentric TR001-250 composé de :

- Du standard contenant 5.10^6 copies/mL
- Du contrôle interne de reproductibilité (CI)
- Du Mix Super Script™ III RT/Platinum
- Reaction Mix 2x
- Amorces A
- Amorces B
- Sonde C

2-9-Méthode

2-9-1-Confection des DBS pour la PCR-ADN

Le prélèvement se fait au niveau du talon d'un nouveau-né sur le côté latéral ou médial du pied (en vert sur le dessin).

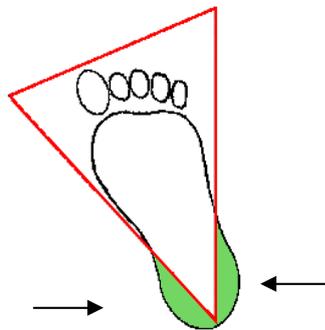


Figure 9 : Site de piqure (en vert)

Après avoir aseptisé le site de piqure, on réalise une incision à l'aide d'une lancette. L'on élimine la première goutte de sang avec du coton puis on exerce une pression avec l'index pour former une grosse goutte de sang qu'on dépose sur le cercle du papier filtre. Tous les cercles de la carte doivent être remplis.

On laisse sécher les cartes à température du laboratoire et l'abri du soleil sur un rack pendant au moins 3h ou toute une nuit. Puis on les range dans des sachets plastiques avec un dessiccant et conservé à -20°C.

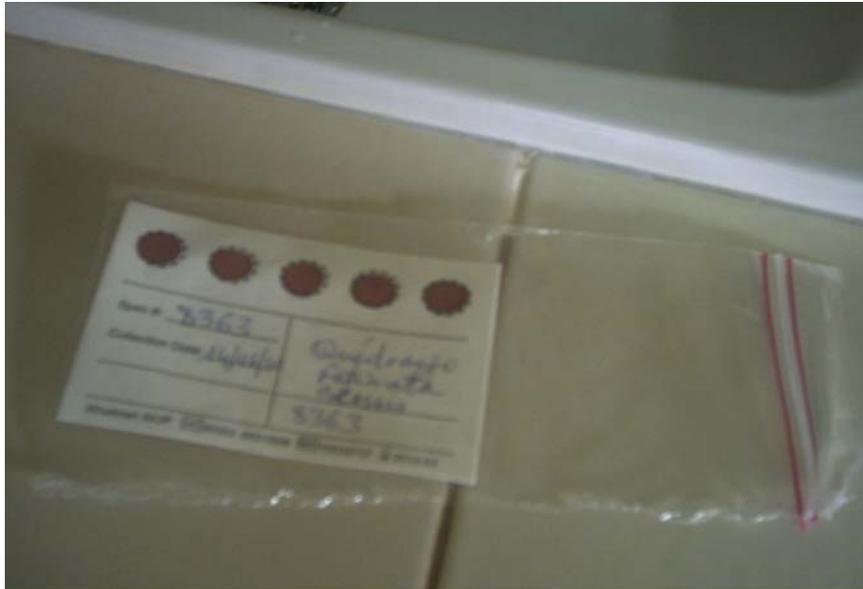


Figure 10 : une carte de DBS

2-9-2-Extraction de l'ADN

Elle se fait avec le kit d'extraction sur les DBS dans la salle d'extraction.

➤ Principe de la méthode d'extraction

Ce kit d'extraction utilise les propriétés de liaison de la colonne de centrifugation QI Amp à base de silice pour isoler l'ADN proviral des lysats des échantillons en présence de réactifs de dénaturation. Ces échantillons sont lysés sous l'action de réactifs spécialement formulés pour séparer les particules virales, libérer les acides nucléiques et protéger l'ADN de la digestion des nucléases. Les produits résultant de la lyse sont transférés dans la colonne de centrifugation QI Amp pour lier l'ADN. Une fois lié à la matrice de la colonne, les acides nucléiques sont purifiés à l'aide de tampons de lavage pour éliminer

les agents contaminants qui inhibent la réaction de polymérisation en chaîne. Les acides nucléiques purifiés sont élués avec un tampon AVE ou de l'eau spéciale biologie moléculaire par centrifugation de la colonne.

➤ **Mode opératoire**

- *Préparation des réactifs pour l'extraction*

- Préparation du tampon AL :

Agiter le tampon AL et bien agiter avant l'emploi. Il se conserve à la température de laboratoire (15-25°C).

- Préparation du tampon AW1 :

Ajouter 25 mL d'éthanol absolu au flacon de 19mL contenant le tampon et homogénéiser. Il se conserve à la température du laboratoire.

- Préparation du tampon AW2 :

Ajouter 30 mL d'éthanol absolu au flacon de 13 mL contenant le tampon et homogénéiser. Conserver à la température du laboratoire.

- *Préparation des échantillons*

Recueil des spots de sang à partir des DBS :

Nous avons découpé 2 cercles du papier buvard à l'aide d'une perforatrice qui est nettoyée après chaque échantillon avec du papier essuie tout imbibé de désinfectant. Les morceaux de spots découpés sont recueillis dans un tube eppendorf.

- *Lyse cellulaire :*

- Ajouter 360 μ L de tampon ATL (tous les cercles imprégnés de sang et découpés doivent être trempés dans le tampon),
- Incuber à 85°C pendant 10 minutes,
- Centrifuger rapidement,
- Ajouter 40 μ L de protéinase K,
- Agiter pendant 20 secondes,
- Incuber à 56°C pendant une heure,
- Centrifuger rapidement,
- Récupérer le surnageant dans un autre eppendorf,
- Ajouter 360 μ L de tampon AL et vortexer aussitôt,
- Incuber à 70°C pendant 10 minutes,
- Centrifuger brièvement.

- *Précipitation des acides nucléiques :*

Lorsqu'on ajoute de l'éthanol absolu (360 μ L) dans les tubes contenant les échantillons cela entraîne la précipitation des acides nucléiques. On agite 15 secondes puis on centrifuge pendant une minute à 16000 rpm.

- *Capture de l'ADN :*

Elle est due à la propriété qu'à la colonne de retenir les acides nucléiques. On identifier autant de colonne qu'il ya d'échantillons et on les dispose sur un tube collecteur. Ensuite on dépose 630 μ L de lysat dans chaque colonne qu'on referme avant de centrifuger à 6000 rpm pendant une minute.

- *Lavage avec le tampon AW1 :*

On dépose dans chaque colonne 500 µL de tampon AW1 puis on centrifuge les colonnes pendant une minute à 6000 rpm. Ensuite on dépose chaque colonne sur un tube collecteur propre.

- *Lavage avec le tampon AW2 :*

On dépose dans chaque colonne 500 µL de tampon AW1 puis on centrifuge les colonnes pendant une minute à 6000 rpm. Ensuite on dépose chaque colonne sur un tube collecteur propre.

- *Récupération de l'ADN :*

Pour récupérer les acides nucléiques des colonnes, on ajoute 60 µL de tampon AVE dans les colonnes, on centrifuge pendant une minute à 6000 rpm. On jette les colonnes et on garde les tubes collecteurs contenant l'éluât. Cet éluât contient l'ARN ainsi extrait et pur qui est conservé à +4°C pour être amplifié immédiatement sinon à -80°C.

- *Préparation des standards*

Le standard ADN prêt à l'emploi contient 3.10^6 copies/mL. La gamme est préparée à partir d'un aliquot de 10 µL de ce standard en faisant des dilutions de raison 10 jusqu'à 3.10^2 copies/ml dans des tubes eppendorf.

2-9-4-Amplification de l'ADN

Le kit est un test de PCR en temps réel pour la détection qualitative ou quantitative de l'ADN cellulaire du VIH-1. La PCR en temps réel (RT-PCR)

permet d'obtenir une quantification précise des produits de PCR pendant la phase exponentielle du processus d'amplification.

➤ **Principe de l'amplification**

Il s'agit d'une PCR par hydrolyse d'une sonde nucléotidique doublement marquée avec un groupement 5' reporter et un groupement 3' quencher. Pendant la PCR, les amorces sens et anti-sens s'hybrident à une séquence spécifique au niveau des amplicons. La sonde contenue dans le même mélange réactionnel s'hybride à une séquence cible de l'amplicon. Lorsque la sonde est intacte, la proximité spatiale entre le reporter et le quencher inhibe la fluorescence du reporter principalement par un transfert d'énergie de type Forster.

Pendant la PCR, la sonde se fixe spécifiquement entre les deux sites où sont hybridés les amorces sens et anti-sens et inhibe toute activité polymérase de la Taq polymérase, mais active la fonction 5'-3' exo nucléase qui clive la sonde entre le reporter et le quencher. Le reporter, libéré du quencher, émet un signal fluorescent enregistré en temps réel par des capteurs. Ainsi, débarrassée des fragments de sonde, la séquence cible peut être lue et polymérisée par la Taq polymérase. L'augmentation du signal de fluorescence est détectée seulement si la séquence cible est complémentaire à la sonde et si elle est amplifiée pendant la PCR. Ainsi, une amplification non spécifique ne peut pas être détectée. Grâce à ce principe réactionnel, l'augmentation de la fluorescence est directement proportionnelle à l'amplification de la cible pendant la PCR. L'évolution de l'amplification est représentée par une courbe d'allure sigmoïde pouvant être divisé en deux phases :

- au début de la phase d'amplification exponentielle, le moment où le signal sort du bruit de fond correspond à un certain nombre de cycles

appelé Ct (Threshold Cycle) ; au cours de cette phase d'amplification exponentielle, la quantité de produits de PCR obtenue à chaque moment est directement fonction du nombre de copie initial ;

- une phase de plateau qui correspond à un ralentissement de l'amplification due à un épuisement des réactifs.

➤ **Mode opératoire**

- *Préparation du mélange réactionnel (le mix)*

Elle a lieu dans la salle de mix. Le fabricant donne les volumes à prélever pour un échantillon. Pour connaître le volume total de mix à préparer il suffit de multiplier ce volume par le nombre d'échantillon sans oublier d'ajouter les standards.

Dans un tube eppendorff l'on prépare le mélange réactionnel en prélevant les volumes suivants : mélange réactionnel 2x (25 µL), amorce A (1 µL), amorce B (1 µL), sonde C (1 µL), eau qualité biologie moléculaire (2 µL) .

Nous avons reparti le mélange dans les puits d'une plaque d'amplification après l'avoir bien homogénéiser. Ensuite on ferme la plaque avec un film autocollant optique appliqué soigneusement puis on la transfère dans le thermocycleur mis en marche 30 minutes auparavant.

- Puis on effectue le programme d'amplification suivant :

1 cycle ----- 2 minutes à 50°C
1 cycle ----- 10 minutes à 95°C (activation de l'enzyme)
50 cycles : 15 secondes ----- 95°C (dénaturation)
1 minute ----- 60°C (hybridation)



Figure 11 : Thermocycleur Classique “96 puits”(ABI PRISM 7000)

2-9-5-Lecture et interprétation des résultats

L'automate est doté d'un système permettant d'analyser les résultats. Il procède de la façon suivante :

- il détermine la valeur seuil de la réaction ainsi que la valeur Threshold Cycle (Ct) de chaque standard de la gamme, c'est-à-dire l'intersection entre la valeur seuil et la courbe d'amplification,
- Sur la droite des abscisses sont reportées les valeurs CT correspondants aux échantillons de valeurs inconnues, puis sont extrapolés le nombre de copies d'ADN/PCR. Les résultats sont qualitatifs.

2-9-6-Collecte des échantillons pour la PCR-ARN

Les échantillons de sang sont prélevés chez la population d'étude par ponction au niveau de la veine fémorale et recueilli dans un tube avec un anti

coagulant (EDTA-K₃). Les prélèvements subissent une centrifugation à 2000 tours/minute pendant 15 minutes à +4°C afin de séparer le plasma du culot globulaire. Le plasma est ensuite décanté et aliquoté dans des cryotubes et conservé à +4°C s'il sera traité le même jour, sinon à -80°C.

2-9-7-Extraction de l'ARN plasmatique

Elle se fait à l'aide du kit d'extraction (QI Amp Viral RNA Mini Kit 52904) à partir du plasma.

➤ Principe de la méthode d'extraction

Ce kit d'extraction utilise les propriétés de liaison de la colonne de centrifugation (QI Amp) à base de silice pour isoler l'ADN proviral des lysats des échantillons en présence de réactifs de dénaturation. Ces échantillons sont lysés sous l'action de réactifs spécialement formulés pour séparer les particules virales, libérer les acides nucléiques et protéger l'ADN de la digestion des nucléases. Les produits résultant de la lyse sont transférés dans la colonne de centrifugation QI Amp pour lier l'ADN. Une fois lié à la matrice de la colonne, les acides nucléiques sont purifiés à l'aide de tampons de lavage pour éliminer les agents contaminants qui inhibent la réaction de polymérisation en chaîne. Les acides nucléiques purifiés sont élués avec un tampon AVE ou de l'eau spéciale biologie moléculaire par centrifugation de la colonne.

➤ Mode opératoire

- *Préparation des réactifs*
 - Préparation du mélange tampon AVL et l'ARN carrier,

- Dissoudre l'ARN carrier lyophilisé dans 310 μ L de tampon AVE. Si nécessaire, dissoudre les précipités éventuels présents dans le tampon AVL en l'incubant à 80°C,
- Préparer la solution AVL avec l'ARN entraîneur/AVE en calculant le volume ARN entraîneur/ARN nécessaire selon le nombre de tubes à extraire,
- Préparation du tampon AW1 :
Ajouter 25 mL d'éthanol absolu au flacon contenant 19 mL de tampon, conserver à la température du laboratoire.
- Préparation du tampon AW2 :
Ajouter 30mL d'éthanol absolu au flacon de 13mL de tampon concentré, homogénéiser et conserver à la température du laboratoire.

- *Préparation des échantillons*

Ramener les échantillons à la température du laboratoire

- *Lyse virale :*

Elle se fait en ajoutant 130 μ L de tampon AVL/ARN Carrier dans un tube contenant 200 μ L d'échantillon. On agite pendant 15 secondes puis on incube à la température du laboratoire pendant 10minutes avant de centrifuger.

- *Précipitation des acides nucléiques :*

Lorsqu'on ajoute de l'éthanol absolu (800 μ L) dans les tubes contenant les échantillons cela entraîne la précipitation des acides nucléiques. On agite 15 secondes puis on centrifuge pendant une minute à 16000 rpm.

- *Capture des acides nucléiques :*

Elle est due à la propriété qu'à la colonne de retenir les acides nucléiques. On identifie autant de colonne qu'il ya d'échantillons et on les

dispose sur un tube collecteur. Ensuite on dépose 630 μ L de lysat dans chaque colonne qu'on referme avant de centrifuger à 6000 rpm pendant une minute. Après la centrifugation on place les colonnes sur des tubes collecteurs propres et on élimine ceux contenant l'effluent. On procède de la même façon pour le reste du lysat.

- *Lavage avec le tampon AW1 :*

On dépose dans chaque colonne 500 μ L de tampon AW1 puis on centrifuge les colonnes pendant une minute à 6000 rpm. Ensuite on dépose chaque colonne sur un tube collecteur propre.

- *Lavage avec le tampon AW2 :*

Dans chaque colonne, on dépose 500 μ L de tampon AW2 puis on centrifuge à 2000 rpm pendant 2 minutes. On replace les colonnes sur des tubes collecteurs propres puis on centrifuge une deuxième fois à 2000 rpm pendant 3 minutes pour éliminer complètement le tampon.

- *Récupération de l'ARN :*

Pour récupérer les acides nucléiques des colonnes, on ajoute 60 μ L de tampon AVE dans les colonnes, on centrifuge pendant une minute à 6000 rpm. On jette les colonnes et on garde les tubes collecteurs contenant l'éluât. Cet éluât contient l'ARN ainsi extrait et pur qui est conservé à +4°C pour être amplifié immédiatement sinon, conservé à -80°C.

- *Préparation de la gamme*

Elle se fait à partir du standard contenant 5.10^6 copies/mL. On réalise une série de dilution de raison 10 jusqu'à 5.10^2 copies/mL avec de l'eau qualité biologie moléculaire dans des 4 tubes eppendorf identifiés de S_1 à S_4 .

2-9-8-Amplification de l'ARN plasmatique

Le kit GENERIC HIV charge viral est un test de PCR en temps réel pour la détection quantitative et qualitative du VIH-1 dans le plasma. La PCR en temps réel permet d'obtenir une quantification précise des produits de PCR pendant la phase exponentielle du processus d'amplification.

➤ Principe de l'amplification

Il s'agit d'une PCR par hydrolyse d'une sonde nucléotidique doublement marquée avec un groupement 5' reporter et un groupement 3' quencher. Pendant la PCR, les amorces sens et anti-sens s'hybrident à une séquence spécifique au niveau des amplicons. La sonde contenue dans le même mélange réactionnel s'hybride à une séquence cible de l'amplicon. Lorsque la sonde est intacte, la proximité spatiale entre le reporter et le quencher inhibe la fluorescence du reporter principalement par un transfert d'énergie de type Forster.

Pendant la PCR, la sonde se fixe spécifiquement entre les deux sites où sont hybridés les amorces sens et anti-sens et inhibe toute activité polymérase de la Taq polymérase, mais active la fonction 5'-3' exo nucléase qui clive la sonde entre le reporter et le quencher. Le reporter, libéré du quencher, émet

un signal fluorescent enregistré en temps réel par des capteurs. Ainsi, débarrassée des fragments de la sonde, la séquence cible peut être lue et polymérisée par la Taq polymérase. L'augmentation du signal de fluorescence est détectée seulement si la séquence cible est complémentaire à la sonde et si elle est amplifiée pendant la PCR. Ainsi, une amplification non spécifique ne peut pas être détectée. Grâce à ce principe réactionnel, l'augmentation de la fluorescence est directement proportionnelle à l'amplification de la cible pendant la PCR. L'évolution de l'amplification est représentée par une courbe d'allure sigmoïde pouvant être divisé en deux phases (figure 6) :

- Au début de la phase d'amplification exponentielle, le moment où le signal sort du bruit de fond correspond à un certain nombre de cycles appelé Ct (Threshold Cycle) au cours de la phase d'amplification exponentielle la quantité de produits de PCR obtenue à chaque moment est directement fonction du nombre de copies initial,
- une phase de plateau qui correspond à un ralentissement de l'amplification due à un épuisement des réactifs,

➤ **Mode opératoire**

- *Préparation du mélange réactionnel (le mix)*

Elle a lieu dans la salle des mix. On détermine le nombre de tubes et on calcule les volumes nécessaires pour préparer le mix.

Dans un tube eppendorf, on prépare le mélange réactionnel avec les amorces (0,5µL pour l'amorce A et l'amorce B), la sonde C (0,5 µL), l'enzyme (0,5 µL), l'eau (0,5 µL) et le mix (12,5 µL).

On homogénéise bien le mélange ainsi obtenu avant de le distribuer dans les puits de la plaque d'amplification (15 μ L dans chaque puits).

Dans la salle d'amplification, on agite les lysats et les standards avant d'en distribuer 10 μ L dans les puits.

Ensuite on referme la plaque avec le film auto collant optique qu'on recouvre du tapis gris avant d'introduire l'ensemble dans le thermocycleur.

Effectuer le programme suivant :

- 48°C pendant 30 minutes pour la transcription reverse,
- 95°C pendant 10 minutes pour l'activation de l'enzyme,
- 50 cycles .95°C pendant 15 secondes pour la dénaturation de l'ARN,
- 60°C pendant une minute pour l'hybridation.

L'élongation des amorces a lieu durant le passage de 60°C à 95°C.

2-9-10-Lecture et interprétation des résultats

L'automate est doté d'un système permettant d'analyser les résultats. Il procède de la façon suivante :

- il détermine la valeur seuil de la réaction ainsi que la valeur Threshold Cycle (Ct) de chaque standard de la gamme, c'est-à-dire l'intersection entre la valeur seuil et la courbe d'amplification,
- sur la droite des abscisses sont reportées les valeurs CT correspondants aux échantillons de valeurs inconnues, puis sont extrapolés le nombre de copies d'ADN/PCR. Les résultats sont qualitatifs.

2-10-Analyse et traitement des données

Les données recueillies étaient compilées manuellement et ont servi à mesurer les variables retenues pour notre étude. Le traitement et l'analyse des données se faisaient par un ordinateur à l'aide du logiciel EPI-INFO version 3.3.2. Les tableaux ont été réalisés par le logiciel Microsoft Office Excel 2007. Les tests utilisés pour la comparaison des fréquences étaient le test de Khi carré quand aucune valeur à l'intérieur du tableau n'était inférieure à 5 et le test exact de Fisher dans le cas échéant. La différence a été considérée significative pour $p < 0,05$.

RESULTATS

III-Résultats

3.1-Caractéristiques sociodémographiques

3.1.1-Effectif

Au total 60 enfants de moins de 18 mois nés de mère infectée par le VIH-1 ont été inclus dans l'étude.

3.1.2-Age

L'âge des enfants variait entre 3 semaines et 12 mois avec une moyenne de $20,95 \pm 12,1$ semaines.

3.1.3-Sexe

Les garçons étaient au nombre de 28, soit un sexe-ratio de 0,87.

3.1.4-Type d'allaitement

3.1.4.1- Répartition des enfants selon le type d'allaitement

Sur un total de 60 dossiers, 32 étaient dûment remplis. L'allaitement artificiel exclusif était le plus pratiqué par les mères comme le montre le tableau I ci-dessous.

Tableau I : Répartition des enfants en fonction du type d'allaitement

Type d'allaitement	Effectif	Pourcentage(%)
AME	8	25
AAE	24	75
AM	0	0
Total	32	100

3.1.1.2-Type d'allaitement en fonction de l'âge

Tableau II : Type d'allaitement en fonction de l'âge

Age (mois)	Type d'allaitement		Total
	AME	AAE	
] 0-3]	2	7	9
] 3-6]	4	12	16
] 6-9]	0	2	2
] 9-12]	2	3	5
Total	8	24	32

3.2-Caractéristiques thérapeutiques

Sur 36 dossiers dument remplis, 34 enfants ont bénéficié de la prophylaxie ARV et 35 avait reçu le cotrimoxazole.

Afin de minimiser le taux de transmission mère enfant, tout enfant né de mère infectée bénéficie d'une prophylaxie ARV. Il s'agit de la Névirapine en dose unique et de la Zidovudine pendant 14 jours.

Un traitement à base de cotrimoxazole est également initié au bout de 40 jours de vie de l'enfant afin de prévenir les infections opportunistes.

3.3-Résultats biologiques

3.3.1-Résultats sérologiques

3.3.1.1-Type de VIH

Sur un total de 60 enfants ayant subi le test, 55 avaient une sérologie rétrovirale positive dont 54 infectés au VIH-1 comme le montre la figure 8.

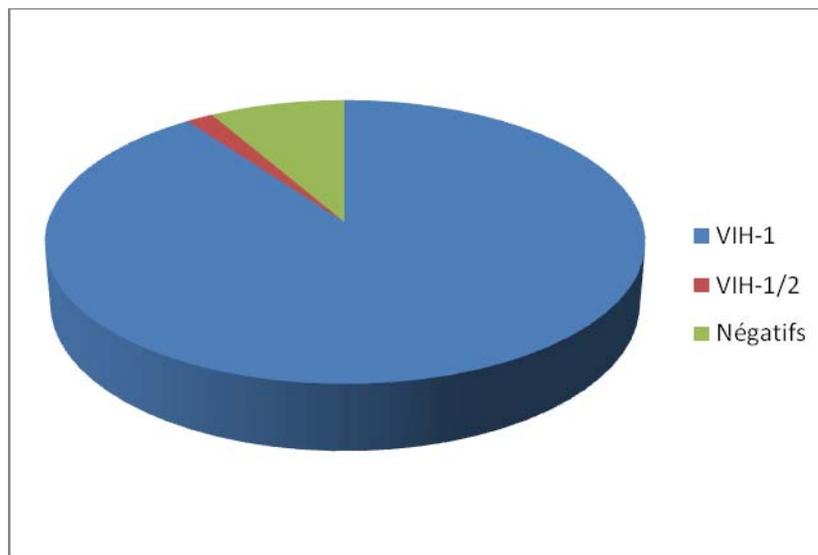


Figure 12 : Répartition des enfants en fonction du type de VIH

3.3.1.2- Résultats de la sérologie en fonction de l'âge

Afin de voir la répartition des résultats de la sérologie selon l'âge, les enfants ont été regroupés dans deux classes : la tranche d'âge de]0-6] et celle de]6-12]. Sur un total de 45 enfants âgés de 0-6 mois, 43 avaient une SRV positive.

Parmi les 15 enfants âgés de 6-12 mois, 12 avaient une SRV positive.

3.3.2-Résultats virologiques

3.3.2.1- La PCR-ARN sur plasma

3.3.2.1.1-Résultats de la PCR-ARN plasmatique

Sur un total de 60 enfants, seulement 4 (soit 6,7%) avaient un résultat de PCR-ARN positif comme l'indique le tableau III.

Tableau III : Répartition des enfants en fonction des résultats de la PCR-ARN

PCR-ARN	Effectif	Pourcentage(%)
Négatif	56	93,3
Positif	4	6,7
Total	60	100,0

3.3.2.1.2-Résultats de la PCR-ARN selon la sérologie

Au total, 51 enfants avaient une SRV et un résultat de PCR-ARN positifs comme le montre le tableau IV.

Tableau IV : Résultats de la PCR-ARN en fonction de la sérologie

Sérologie	PCR-ARN		Total
	Négatif	Positif	
Négatif	5	0	5
Positif	51	4	55
Total	56	4	60

La relation entre les résultats de la PCR-ARN et la sérologie rétrovirale n'est pas significative ($p=0,69$).

3.3.2.1.3-Résultats de la PCR-ARN selon le traitement ARV

Parmi les 35 enfants qui avaient reçu la prophylaxie ARV à la naissance, 32 avaient un résultat négatif à la PCR ARN comme le montre le tableau V.

Tableau V : Résultats de la PCR-ARN en fonction du traitement ARV.

Traitement ARV	PCR-ARN		Total
	Négatif(%)	Positif(%)	
Non	0(0,0)	1(100,0)	1
Oui	32(94,1)	2(5,9)	34
Total	32(91,4)	3(8,6)	35

Il n'existe pas de relation significative entre le traitement ARV qu'ont reçu les enfants à la naissance et les résultats de la PCR-ARN ($p=0,08$).

3.3.2.1.4-Relation entre les résultats de la PCR-ARN, la SRV et l'âge

Tableau VI : Résultats de la PCR-ARN en fonction de la sérologie et de l'âge

Age	Sérologie		PCR- ARN	
	Négatif	Positif	Négatif	Positif
] 0-3]	0	19	17	2
] 3-6]	2	24	25	1
] 6-9]	0	9	9	0
] 9-12]	3	3	5	1
Total	5	55	56	4

3.3.2.2-La PCR-ADN sur DBS

3.3.2.2.1-Résultats de la PCR-ADN sur DBS

Sur un total de 60 enfants, seulement 4 (soit 6,7%) ont été diagnostiqués positif comme nous l'indique le tableau VII.

Tableau VII : Résultats de la PCR-ADN

PCR-ADN	Effectif	Pourcentage(%)
Négatif	56	93,3
Positif	4	6,7
Total	60	100,0

3.3.2.2.2-Résultats de la PCR-ADN en fonction de la sérologie

Au total, 51 enfants avaient une SRV et un résultat de PCR-ADN positif, comme le montre le tableau VIII.

Tableau VIII : Résultats de la PCR-ADN en fonction de la sérologie des enfants

Sérologie	PCR-ADN		Total
	Négatif	Positif	
Négatif	5	0	5
Positif	51	4	55
Total	56	4	60

La relation entre les résultats de la PCR-ADN et la sérologie rétrovirale n'est pas significative de ($p=0,69$).

3.3.2.2.3-Résultats de la PCR-ADN en fonction du traitement ARV

Parmi les 35 enfants qui avaient reçu la prophylaxie ARV à la naissance, 32 avaient un résultat négatif à la PCR-ADN comme le montre le tableau IX.

Tableau IX : Résultats de la PCR-ADN en fonction du traitement ARV

Traitement ARV	PCR-ADN		Total
	Négatif(%)	Positif(%)	
Non	0(0,0)	1(100,0)	1
Oui	32(94,1)	2(5,9)	34
Total	32(91,4)	3(8,6)	35

La relation entre le traitement ARV et les résultats de la PCR-ADN n'est pas significative ($p=0,08$).

3.3.2.2.6-Relation entre les résultats de la PCR-ADN, la SRV et l'âge#

Tableau X : Résultats de la PCR-ADN et de la sérologie en fonction des tranches d'âge.

Age	Sérologie		PCR-ADN	
	Négatif	Positif	Négatif	Positif
] 0-3]	0	19	17	2
] 3-6]	2	24	25	1
] 6-9]	0	9	9	0
] 9-12]	3	3	5	1
Total	5	55	56	4

3.3.3-Performance de la technique PCR-ADN sur DBS

Comme nous l'indique le tableau XI, il n'existe pas de résultats discordants entre les résultats de la PCR-ARN plasmatique et la PCR-ADN sur DBS.

Tableau XI : Comparaison des techniques PCR-ARN et PCR-ADN

PCR-ADN	PCR-ARN		Total
	Négatif (%)	Positif(%)	
Négatif	56 (100,0)	0 (0,0)	56 (93,3)
Positif	0 (0,0)	4(100,0)	4 (6,7)
Total	56 (93,3)	4(6,7)	60 (100,0)

La relation entre les résultats de la PCR-ARN et ceux de la PCR-ADN est significative ($p=0,0000021$).



DISCUSSION
COMMENTAIRES

IV-Discussion-commentaires

4.1-Caractéristiques sociodémographiques

4.1.1-L'effectif

Notre étude a porté sur un total de 60 enfants. Cet effectif est inférieur à celui de Ingrid A. et *al.* [43] à Lima au Peru en 2000 , Fisher A. et *al.* [44] à Kigali au Rouanda en 2002, qui avaient des effectifs respectifs de 128 et 150 enfants. La petite taille de notre échantillon s'explique par le manque de réactif pour réaliser les deux techniques pendant la période de notre étude.

4.1.2-L'âge

L'âge des enfants variait entre 3 semaines et 12 mois.

Ces valeurs sont proches de celles de Tracy et *al.* au Botswana, et Chin-Yih et *al.* au Cameroun en 2006 qui avaient respectivement trouvé des extrêmes d'âge de 6 semaines à 17 mois, et de 1 jour à 46 semaines. [45, 46].

Ces extrêmes d'âge s'expliqueraient par le fait que pour une meilleure prise en charge des enfants nés de mère infectée, le prélèvement doit être fait le plus tôt possible pour un diagnostic précoce, étant donné que la TME peut survenir pendant la grossesse, le travail d'accouchement et l'allaitement.

4.1.3-L'allaitement

4.1.3.1-Type d'allaitement

Sur un total de 32 enfants, 24 (soit 75%) étaient nourris par le lait artificiel de façon exclusive. Ces résultats s'expliqueraient par le respect des textes en ce qui concerne les recommandations de la PTME.

4.1.3.2-Type d'allaitement en fonction de l'âge

Nos résultats de l'allaitement en fonction de l'âge montrent que parmi les enfants âgés de 4 à 12 mois, 17 enfants étaient sous AAE contre 6 sous AME.

Ces résultats montrent que les mères respectent les recommandations de la PTME concernant l'arrêt de l'AME à 4 mois pour relayer avec l'AAE.

4.2-Caractéristiques thérapeutiques

Au total 97,4% des enfants avaient bénéficié de la prophylaxie ARV à la naissance. Il s'agissait de la Névirapine en prise unique et de la Zidovudine pendant 14 jours.

Nos valeurs sont proches de celles de Tracy et *al.* [45] qui avaient rapporté en 2005 au Botswana que 94% d'enfant avaient bénéficié de cette prophylaxie ARV.

4.3-Résultats biologiques

4.3.1-Résultats sérologiques

4.3.1.1-Type de VIH

Nos résultats montrent que parmi les enfants qui avaient une SRV positive, nous avons trouvé 98% de VIH-1 et 2% de co-infection VIH-1 et VIH-2. Nos résultats sont proches de ceux de Simporé J et al [47] qui trouvaient à Ouagadougou 97,37 % de sérotype 1 avec 0,82 % de co-infection VIH-1 et VIH-2. Ilboudo et Nadembéga [50; 51] trouvaient respectivement à Ouagadougou 95,1 % et 87 % de sérotype 1 avec 1,4 % et 13 % de co-infection VIH-1 et VIH-2. Ceci est lié au fait que dans notre échantillon les femmes infectées par le VIH-2

étaient systématiquement exclues de l'étude car les tests de diagnostic moléculaire dont on dispose au Burkina Faso ne permettent pas de quantifier le VIH-2.

Cependant, ils sont assez différents de ceux de N'Zi et *al* à Abidjan [52] 72,6 % de co-infection VIH-1 et VIH-2 à Abidjan. Le VIH-2 est retrouvé dans les Zones urbaines de l'Afrique de l'ouest et la Côte d'Ivoire est l'un des pays où la prévalence est élevée [53].

Nos résultats confirment tout de même la forte représentativité du séro-type 1 au Burkina Faso.

4.3.1.2-Sérologie en fonction de l'âge

Nos résultats de la sérologie en fonction de l'âge ont montré 43 SRV positives (soit 95,5%) chez les enfants de 0 à 6 mois.

Ces résultats s'expliquent par le fait que les anticorps maternels de type Ig G transmis à l'enfant par voie placentaire persistent durant les 6 premiers mois de vie et tendent à diminuer à partir de 10 mois pour disparaître à 18 mois.

4.3.2-Résultats virologiques

4.3.2.1-La PCR-ARN sur plasma

4.3.2.1.1-Résultats de la PCR-ARN en fonction de la sérologie

Nos résultats de la PCR en fonction de la sérologie ont montré que sur les 60 enfants chez qui une SRV et une PCR-ARN ont été réalisées, nous avons obtenu 51 résultats discordants : 51 enfants avaient une SRV positive et une PCR-ARN négative. Ceci confirme qu'il n'y a pas de lien significatif entre les résultats de la PCR et la SRV ($p=0,69$).

Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la SRV n'est pas le test de diagnostic indiqué pour les enfants de moins de 18 mois.

4.3.2.1.2-Résultats de la PCR-ARN en fonction de l'âge et de la SRV

Sur un total de 45 enfants chez lesquels nous avons réalisé une SRV et une PCR-ARN, nous avons trouvé qu'il y avait plus de résultats positifs donnés par la SRV (43 SRV positives) que par la PCR-ARN (3 résultats de PCR-ARN positifs) chez les enfants appartenant à la tranche d'âge de 0-6 mois.

Ces résultats s'expliqueraient par le fait que durant les premiers mois de vie de l'enfant, la PCR-ARN est plus indiquée que la SRV pour le diagnostic précoce du VIH-1 chez les enfants nés de mère infectée.

4.3.2.2-La PCR-ADN sur DBS

4.3.2.2.1-Résultats de la PCR-ADN sur DBS

Nous avons trouvé 4(soit 6,7%) enfants diagnostiqués positifs par cette technique. Cette valeur est proche de celle de Janet et *al* [55] en 2007 en Afrique du Sud qui trouvait 7,5% d'enfants diagnostiqués positifs au VIH-1.

4.3.2.2.2-Résultats de la PCR-ADN en fonction de la sérologie

Nos résultats de la PCR-ADN en fonction de la SRV montrent que sur un total de 60 enfants, 51(soit 95,5%) avaient une SRV positive et une PCR-ADN négative. Cela peut s'expliquer par le fait que la PCR est le test de diagnostic du VIH-1 le plus indiqué chez les enfants avant 18 mois.

4.3.2.2.3-Résultats de la PCR-ADN en fonction de la sérologie et de l'âge

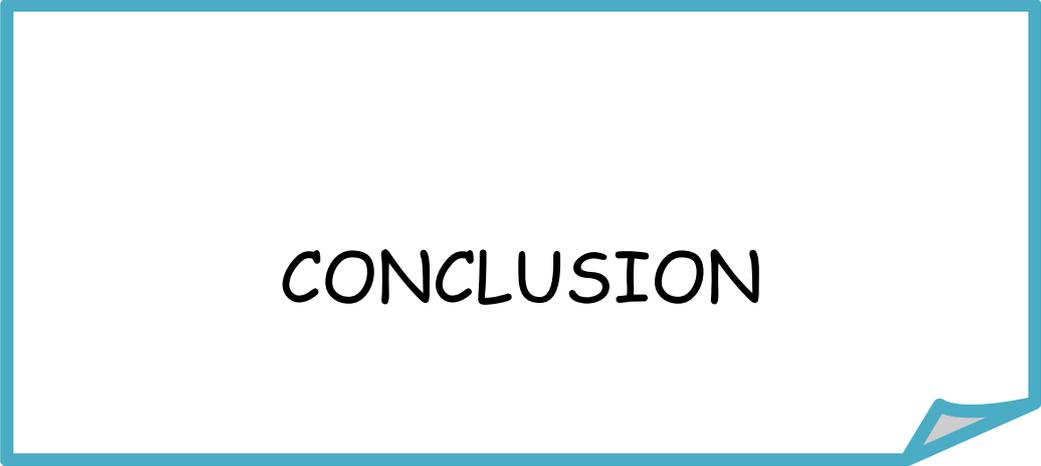
Nos résultats de la PCR-ADN en fonction de la SRV et de l'âge montrent que, parmi les enfants (45) âgés de 0 à 6 mois, 43 avaient une SRV positive, tandis que 3 enfants seulement avaient une PCR-ADN positive. Egalement, pour cette même tranche d'âge, nous avons trouvé 42 enfants dont la PCR-ADN était négative et 2 dont la SRV était positive.

Nos résultats confirment ceux de la PCR-ARN en fonction de la sérologie qui montraient 95,5% de SRV positifs et de PCR-ARN négatifs et ces résultats croisés avec l'âge confirment que la PCR-ADN est l'outil de diagnostic précoce le plus indiqué chez les enfants durant les six premiers mois de vie.

4.3.3- Performance de la technique de PCR-ADN sur DBS

Notre tableau de comparaison entre la PCR-ARN et la PCR-ADN (tableau XI) montre la relation entre les résultats de la PCR-ARN et ceux de la PCR-ADN est significative ($p=0,0000021$)

Ces résultats montrent que ces deux techniques sont égales et indiquées l'une et l'autre dans le diagnostic précoce de l'infection à VIH-1 chez l'enfant de moins de 18 mois né de mère infectée.



CONCLUSION

CONCLUSION

L'analyse de nos résultats a montré l'intérêt des DBS dans le diagnostic précoce de l'infection à VIH-1 chez les enfants de moins de 18 mois nés de mère infectée. En plus du fait qu'ils ne requièrent qu'un petit volume de sang (50 µL), ils sont faciles à conserver et à transporter, ils peuvent être utilisés pour la détection de l'ADN pro viral grâce à la PCR.

Les résultats de la PCR-ADN sur DBS montrent une bonne corrélation avec ceux de la PCR-ARN plasmatique que nous avons utilisé comme test de référence.

Il est maintenant établi que la sérologie rétrovirale n'est pas le test indiqué pour le diagnostic de l'infection à VIH chez les enfants de moins de 18 mois à cause de la persistance chez ceux-ci des anticorps maternels transmis par voie trans-placentaire. La PCR-ADN est la plus indiquée pour le diagnostic précoce de l'infection à VIH-1 chez les enfants de moins de 18 mois nés de mère infectée. Ce diagnostic précoce se révèle indispensable pour l'instauration d'un traitement antirétroviral chez l'enfant chez qui la maladie a une évolution rapide.

En définitive la technique de PCR-ADN sur DBS pourrait être le test de choix en première intention pour le diagnostic précoce de l'infection à VIH-1 chez l'enfant de moins de 18 mois né de mère infectée dans notre contexte de pays à ressources limitées, car les DBS offrent un moyen de prélèvement, de transport, de conservation et de stockage facile et moins coûteux que le plasma.



SUGGESTIONS

SUGGESTIONS

➤ **Au Ministre de la santé**

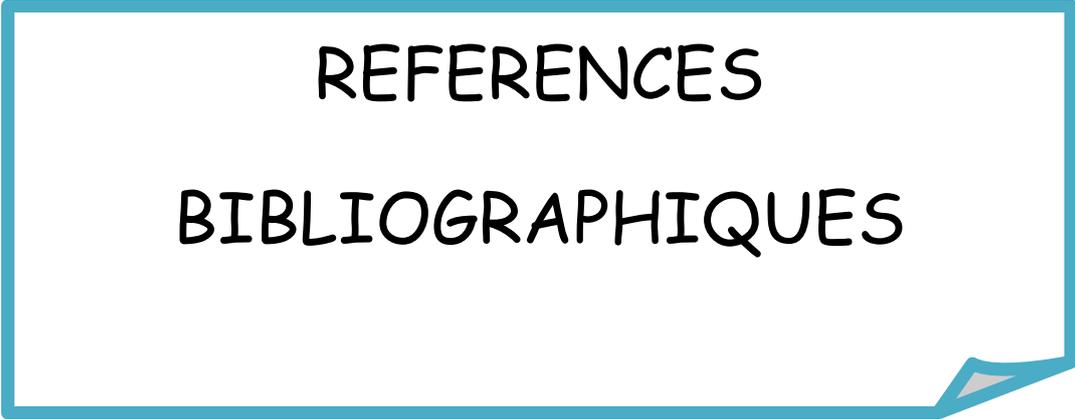
- Renforcer les capacités du SP/CNLS-IST en vue d'établir le programme PTME sur toute l'étendue du territoire,
- Equiper les CHR de matériel permettant de réaliser les tests virologiques,
- Instaurer des formations enfin d'avoir du personnel qualifié pour les techniques de biologie moléculaire utilisées pour le diagnostic précoce chez l'enfant de moins de 18 mois.
- Doter les structures sanitaires les plus reculés de matériel nécessaire à la confection des DBS.

➤ **Aux personnels de santé**

Prendre le soin de remplir correctement la fiche de route qui sera jointe aux DBS.

➤ **Aux parents des enfants exposés au VIH pendant la grossesse**

Après la naissance de l'enfant, le ramener dans la structure sanitaire pour le prélèvement et la confection des DBS en vue du diagnostic précoce à la date indiquée.



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1-Michon C. Infection à VIH. Dans : Bouvenot G., Devulder B., Queneau P., Schaeffer A.eds. Pathologie médicale. Tome 2. Paris : Ed Masson, 1995 : 253-274.

2-ONU-SIDA. Le Rapport sur l'épidémie mondial du SIDA : décembre 2009, p.33-37.

3-Ammann A., Sahai Burrowes : Early diagnosis of HIV infection_in HIV-exposed infants: Can complexity and cost be overcome in resource_poor setting_march 2007,p.1

4-Marlysz C. Knuchel, Boniface J., Cyril S., et al. Adaptation of ultrasensitive HIV-1 p24 antigen assay to dried blood spot testing. *J Acquir Immune Defic Syndr. Vol 44,Num 3, March 1,2007.p.247-253.*

5-World Health Organisation. Early diagnosis of HIV infection in infants and children. Guidance note on the selection of technology for the early diagnosis of HIV in infants and children. p 1-10.

6-Conseil consultative de pharmacologie et Centre Québécois de Coordination sur le SIDA. Guide d'utilisation du test de la charge virale chez des adultes infectés par le virus d'immunodéficience humaine (VIH). Info-médicament. 1998 : 13p.

7-OMS-Intensification de la prévention, du diagnostic, des soins et du traitement lié au VIH pour les nourrissons et les enfants: un cadre de programmation, 2009, 15-30.

8-Direction des Etudes et de la Planification. Tableau de bord santé 2006. Juillet 2007.p61

9-Nicole N., Woottichai K., Baptiste L. et al. Early HIV-1 diagnosis using in house real time amplification on dried blood spots for infants in remote and

resource-limited settings, *J Acquir Immune Defic Syndr.* December 15 2008, Volume 49, 465-471.

10-Choisy M., Woelk C.H., Guegan J-F., Robertson D. Comparative study of adaptative in different human immunodeficiency virus groups and subtypes. *Journal of Virology*, 2004, 78(4):1962-1970.

11-Gallo R.C., Sarin P.S., Gelmann E.P., Robert-Guroff M., Richardson E. Kalyanaraman V.S. et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Sciences*, 1983, 220(4599): 865-7.

12-Clavel F., Guetard , Brun-Vezinet F., Chamaret S., Rey M.A. , Santos –Ferreira M.O. , et al. Isolation of a new human retrovirus from west African patients with AIDS. *Science*. 1986 jul 18, 233(4761):343-6.

13-Janssens G., Répertoire d'analyse de Biologie Clinique. Troisième édition, Septembre 2006 : 242 pages.

14-CNLS-IST : Rapport UNGASS 2008 du Burkina Faso, suivi de déclaration d'engagement sur le VIH/SIDA. Janvier 2008

15-Rouzioux C. , Chaix M-L.-HIV :Epidémiologie et diagnostic.- Dans : **Huraux J.M. , Agut H. , Nicolas J.C. , Peigue-Lafeuille H.** .Traité de virologie Médicale. Paris : Ed Estem 2003 ,332-341.

16-Brun-Vézinet F., Wainberg M.-HIV : Structure ,multiplication et physiopathologie-Dans : **Huraux J.M. , Agut H. , Nicolas J.C. , Peigue-Lafeuille H.** .-Traité de virologie Médicale. Paris : Ed Estem 2003 ;319-327.

17-Barré-Sinoussi F. Virologie Fondamentale de l'infection à VIH-Dans : **Girard P.M., Katlama C., Pialoux G.**-VIH. ,6^{ème} ed.Paris : Doin ,2004 ,2-9.

18-Barré-Sinoussi F., Chermann J.C., Rey F. et al.-Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome(AIDS) , *Science* ,1983 ,220 : 868-871.

- 19- Rouzioux C. ,Chaix M-L.-HIV :Epidémiologie et diagnostic.- Dans : Huraux J.M. ,Agut H. ,Nicolas J.C. ,Peigue-Lafeuille H.-Traité de virologie Médicale. Paris : Ed Estem 2003 ,332-341.**
- 20-OMS.** Le virus de l'immunodéficience humaine et son diagnostic. Manuel de référence à l'usage des personnels de laboratoire. Brazzaville, 2004.
- 21-Denis F., M'Boup S., Sangaré A. et al.-**Le virus de l'immunodéficience humaine : Structure, organisation génétique, réplication. Dans : **Rosenheim M. ,Itouta-Ngaporo A.-**SIDA ,Infection à VIH : aspects en zone tropicale. Paris : Ed Ellipses AUPELF ,1998,366.
- 22-Bonard D., Rouet F., Toni T.A. et al.** Field evaluation of an improved assay using a heat-dissociated P24 antigen for adults mainly infected with HIV-1 CRF02_AG strains in Cote d'Ivoire, West Africa. *J Acquir Immune Defic Syndr. ;2003; 34:267-273.*
- 23-Girard P-M., Katlama C., Pialoux G.** VIH. Paris: Doin Editeurs, 2007:727.
- 24-Saragosti S.** Epidémiologie du VIH-1. *Virologie, 1997; 1: 313- 320.*
- 25-Fauci A-S.** Host factors in the pathogenesis of HIV disease. *Antibiot. Chemother. , 1996, 48:p4-12.*
- 26-Pantaleo G., Graziosi C., Fauci A-S.** Mechanisms of disease: the immunopathogenesis of immunodeficiency virus infection. *N. Engl.JMed, 1993; 328: 327: 336.*
- 27-Daar E-S., Moudgil T., Meyer R-D., Ho D-D.** Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1infection .*N. Engl.J. Med., 1991, 324(14):p961-4.*
- 28-Perrin L., Pawlotsky J-M., Bouvier- Alias M., Sarrazin C., Zeuzem S. et Colucci G.** Multicenter performance Evaluation of a New TaqMan PCR Assay for Monitoring Human Immunodeficiency Virus RNA Load. *J.Clin. Microbiol Dec 2006 P4371 – 4375.*

- 29-Haynes B-F., Pantaleo G., Fauci A-S.** Toward an understanding of the correlate of protective immunity to HIV infection. *Science*, 1996; 271(5247):p324-8.
- 30-Hurax J-M., Nicolas J-C., Agut H. et al.** Traité de virologie médicale. Editions Estem, 2003.
- 31-Coutouly G.** Biologie moléculaire et applications. Dans : Béreaux J. eds. Le technicien d'analyses biologiques. Guide théorique et pratique. Paris : Ed EMI, 2001 : 339-445.
- 32-Etienne J.,** Biochimie génétique et biologie moléculaire. 4^e édition. Paris : Ed Masson, 1998 : 503.
- 33-Kaplan J-C., Delpech M.** La PCR. Dans: Biologie moléculaire et médecine. 2^e édition. Paris. Ed Médecine-Sciences Flammarion, 200 : 558-571.
- 34-UNICEF/UNAIDS/WHO/MSF** Project. Sources and prices of selected medicines and diagnostic for people living with HIV/AIDS. June 2005.
- 35-Tse C., Capeau J.** Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. *Ann. Biol. Clin.* 2003 ;61 : 279-93.
- 36-Bastard J-P., Chambert S., Ceppa F., Coude M., Grapez E., Loric S., Muzeau F. and al.** Les méthodes d'extraction et de purification des ARN. *Ann. Biol. Clin.* 2002 ; 60(5) : 513-23.
- 37-Wattré P.** La biologie moléculaire au service de la virologie médicale quotidienne. Principes méthodologiques. *Ann. Biol. Clin.* 1997; 55(1): 25-31.
- 38-Sebire K., Mc Gavin K., Land S., Middleton T. and Birch C.** Stability of human immunodeficiency virus RNA in blood specimens as measured by a commercial PCR-Based assay. *J. Clin. Microbiol.* 1998 ; 36(2) : 493-98.
- 39-Durand G., Frezet S.** Biologie moléculaire en routine au laboratoire de Bactériologie. DES de Bactériologie. 2002-2003.

40-Lazurl D. La PCR, un procédé de réplication in vitro. Paris : Ed Médicales internationales, 1993 : 387.

41-Delfraissy J-f. et al. Prise en charge thérapeutique des personnes infectées par le VIH. Rapport 2002, Paris; Flammarion Médecines Sciences, 2002:384.

42-Wainberg M., Brun Vezinet F. HIV : épidémiologie et diagnostique, *Virologie* 2003 ,23(2) :335 369.

43-Ronald B-R. ,Thea D. ,Vadim P. et.al.-Early detection of reverse transcriptase activity in plasma of neonates infected with HIV-1 : a comparative analysis with RNA-based and DNA-based testing using polymerase chain reaction,*J Acquir Immune Defic Syndr*, 2001, volume 26, 93-102.

44-Wattré P. La biologie moléculaire au service de la virologie médicale quotidienne. Principes méthodologiques. *Ann. Biol. Clin.* 1997 ; 55(1) : 25-31.

45-Ingrid A-B., Kathryn D-D., Ann J-M., Kathey M-M., Arnd M-H., Alarcon J., Piscocoya J., Velaquez C., Frenkel L.M. Simple, sensitive, and specific detection of human immunodeficiency virus type 1 subtype B DNA in dried blood samples for diagnosis in infants in the field; *Journal of clinical microbiology*, jan. 2001, p. 29-33.

46-Fisher A., Lejczak C., Lambert J., Servais J., Makombe N., Rusine J., Staub T., Hemmer R., Scheider F., Schmit J.C., Arendt V. Simpl DNA extraction method for dried blood spots and comparison of two PCR assays for diagnosis of vertical human immunodeficiency virus type 1 transmission in Rwanda. *Journal of clinical Microbiology*. Jan. 2004, p. 16-20.

47-Tracy C., Amilkar T., Monica S., Khumo S. et al. Early diagnosis of human immunodeficiency virus in infants using polymerase chain reaction on dried blood spots in Bostwana's national program for prevention of mother-to-child

transmission, *The pediatric infectious disease journal*. Vol , number 1, jan. 2008, p. 22-26.

48-Chin-Yih O., Balinandi S., Sawadogo S. et al. Identification of infected infants and young children using real-time RT PCR and dried blood spots from Uganda and Cameroon. *Journal of Virological Methods* 144 (2007) 109-114.

49-Simpore J et al. Reduction of Mother-to-Child Transmission of HIV at Saint Camille Medical Centre in Burkina Faso, *J Med Virol*. 2006, 78(2):148-52.

50-Ilboudo B : Evaluation de l'amylasémie au cours de l'infection à VIH. Thèse doct. Médecine 2004 Université de Ouagadougou UFR/SDS.

51-Nadembéga Christelle W.M. : Dépistage anonyme du VIH, étude de l'évolution des protéines sériques et des CD4+ chez les personnes vivant avec le VIH/SIDA. (Mémoire de DEA) Université de Ouagadougou. B.F UFR/SVT. 2001 45p.

52-N'zi P-K., Coulibaly A., N'Dri K., Ouattara N.D. : Aspect échographiques des atteintes abdominales au cours de l'infection à VIH chez l'adulte: à propos de 146 cas. *Cahier de santé* 1999(2) 9: 85-88.

53-Tersmette et al. Detection and subtyping of HIV-1 isolates with a panel of characterized monoclonal antibodies to HIV p24 gag. *J. Virol*. 1989, 20: 151-153.

54-Koulidiaty Guy Boris : Mesure de la charge virale plasmatique du VIH-1 au laboratoire de biologie moléculaire du CHU-YO : Comparaison de 2 systèmes (LCx HIV ARN Quantitatif versus Abbott Real Time HIV-1. Thèse doct. Pharmacie 2007 ; de Ouagadougou UFR/SDS ; 107p.

55-Janet C.P., Akkers E., Ashraf H. et al. Evaluation of dried whole blood spots obtained by heel or finger stick as an alternative to venous blood for diagnosis

of human immunodeficiency virus type 1 infection in vertically exposed infants in the routine diagnosis laboratory. *Clinical Vaccine Immunology*, Vol. 14, Num. 2, Feb. 2007, p. 201-203.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION/ENONCE DU PROBLEME	2
I-HISTORIQUE	7
I- EPIDEMIOLOGIE	7
2.1-Situation de l'épidémie dans le monde	7
2.2-Situation de l'épidémie au Burkina Faso	8
2.3- Mode de transmission	9
II- LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE (VIH).....	11
3.1-Définition/Classification	11
3.2-Morphologie et Structure.....	12
3.3-Variabilité génétique	15
3.4- Cycle de réplication de virus.....	16
3.5- Immunologie	18
3.6-Evolution immuno-virologique de l'infection à VIH	19
3.7- Histoire naturelle de l'infection à VIH chez l'enfant.....	22
IV-DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE L'INFECTION PAR LE VIH-1.....	25
4.1- Diagnostic direct.....	25
4.2-Diagnostic indirect.....	40
V-DIAGNOSTIC DE L'INFECTION PAR LE VIH CHEZ L'ENFANT DE MOINS DE 18 MOIS	42
1-1-Objectif Général	46
1-2-Objectifs Spécifiques	46
	98

II-METHODOLOGIE.....	49
2-1-Type et période d'étude.....	49
2-2-Cadre de l'étude.....	49
2-3-Population d'étude.....	49
2-4-Critères de la population d'étude	50
2-5-Considérations éthiques.....	50
2-6-Variables d'étude	50
2-7-Méthode d'échantillonnage.....	51
2-9-Méthode	55
III-Résultats.....	71
3.1-Caractéristiques sociodémographiques	71
3.2-Caractéristiques thérapeutiques	72
3.3-Résultats biologiques.....	73
IV-Discussion-commentaires	81
4.1-Caractéristiques sociodémographiques	81
4.2-Caractéristiques thérapeutiques	82
4.3-Résultats biologiques.....	82
CONCLUSION	87
SUGGESTIONS	89
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	91
ANNEXES	
RESUME	
SERMENT DE GALIEN	

RESUME

INTERET DU DRIED BLOOD SPOT OU DBS DANS LE DIAGNOSTIC PRECOCE DE L'INFECTION PAR LE VIH-1 CHEZ L'ENFANT DE MOIND DE 18 MOIS NES DE MERES INFECTEE : Comparaison des résultats de PCR-ARN plasmatique et PCR-ADN sur DBS.

Objectif : Evaluer la performance de la technique PCR-ADN sur DBS dans le diagnostic précoce de l'infection par le VIH-1 chez les enfants de moins de 18 mois nés de mère infectée et comparer les résultats obtenus avec ceux de la PCR-ARN plasmatique chez les mêmes enfants.

Matériel et méthode : Pour cette étude prospective, 60 enfants de moins de 18 mois né de mère infectée par le VIH-1 ont été inclus sur une période de 10 mois (de mai 2009 à février 2010). Chaque enfant avait un échantillon plasmatique obtenu après centrifugation et décantation du sang total veineux et un DBS confectionné avec du sang recueilli par incision au talon. La PCR-ARN sur plasma (kit Qiagen QI Amp RNA), la PCR-ADN sur DBS (kit Qiagen QI Amp DNA) et la sérologie rétrovirale (kit ImmunoCombs) ont été réalisés.

Résultats : L'âge moyen des enfants étaient de $20,95 \pm 12,1$ semaines avec des extrêmes allant de 3 semaines à 12 mois. Le sexe ratio était de 0,87. Sur un total de 60 enfants, 4 (soit 6,7%) avaient un résultat positif à la PCR-ARN plasmatique et à la PCR-ADN sur DBS. La PCR-ADN sur DBS avait une sensibilité de 100% et une spécificité de 100%.

Conclusion : Les DBS sont utilisables par la PCR-ADN dans le diagnostic précoce de l'infection par le VIH-1 chez l'enfant de moins de 18 mois né de mère infectée.

Mots clés : DBS, Diagnostic précoce, PCR-ARN, PCR-ADN, VIH-1

Auteur : SONTIE Ba-Nébhane Sonia ; e-mail : nebhane@yahoo.fr

Annexe : Fiche de collecte

Identification de l'enfant

N° Labo :

N° Dossier :

Prélèvement effectué au :

Sexe : Masculin :

Féminin :

Age : Jours

Mois

Ans

Mère ayant bénéficié de traitement ARV pendant la grossesse

Oui :

Non :

Si oui donner les modules utilisés

.....

.....

Mère ayant bénéficié de prophylaxie ARV/PTME

- pendant la grossesse Oui : Non :

- Pendant le travail d'accouchement Oui : Non :

- Après l'accouchement Oui : Non :

Nouveau né ayant bénéficié de prophylaxie ARV

Oui : Non :

Si Oui, donner le schéma thérapeutique

.....
.....
.....

Enfant sous prophylaxie au Cotrimoxazole

Oui : Non :

Type d'alimentation de l'enfant

- Allaitement maternel exclusif Oui : Non :

- Si Oui :
- En cours

 - Arrêté depuis moins de 6 mois

 - Arrêté depuis moins de 6 semaines

- Allaitement artificiel exclusif Oui : Non :

- Allaitement Mixte Oui : Non :

Technique de diagnostic utilisée

PCR – ADN :

PCR – ARN :

Résultat de la PCR – ADN

Positif :

Négatif :

Résultat de PCR – ARN

Positif :

Négatif :

Charge virale =..... copies / mL

Sérologie rétrovirale de l'enfant

Inconnu :

Négatif :

Positif :

VIH-1 :

VIH-2 :

VIH-1/2 :

SERMENT DE GALIEN

« Je jure en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de L'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

- D'honorer ceux qui m'ont instruite dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- D'exercer dans l'intérêt de la Santé Publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.
- En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.
- Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.
- Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque».

