

BURKINA FASO

UNITE – PROGRES – JUSTICE

MINISTERE DES ENSEIGNEMENTS SECONDAIRE ET SUPERIEUR

UNIVERSITE POLYTECHNIQUE DE BOBO-DIOULASSO (UPB)

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES NATURELLES ET AGRONOMIQUES



Année Universitaire : 2014 - 2015

**Place des herpès virus (HSV-2, CMV et EBV) dans la
survenue d'une ulcération génitale chez des femmes
coïnfectées par le VIH-1 et le HSV-2 dans la ville
de Bobo-Dioulasso**

Mémoire

Présenté et soutenu publiquement le **27 avril 2015**

Pour l'obtention du **Master en Biologie Appliquée et Modélisation des
Systèmes Biologiques (BAMSB)**

Par

BAZIE Wilfried Wenceslas, titulaire d'un doctorat d'Etat en Médecine Humaine

JURY

Directeur de mémoire
Pr Jean-Bosco OUEDRAOGO

Président : Pr Adrien M.G. BELEM

Co-Directrice de mémoire
Dr Diane Célestine VALEA

Membres : Dr Juliette TRANCHOT/ DIALLO

Dr Diane Célestine VALEA

BURKINA FASO

UNITE – PROGRES – JUSTICE

MINISTRE DES ENSEIGNEMENTS SECONDAIRE ET SUPERIEUR

UNIVERSITE POLYTECHNIQUE DE BOBO-DIOULASSO (UPB)

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES NATURELLES ET AGRONOMIQUES



Année Universitaire : 2014 - 2015

**Place des herpès virus (HSV-2, CMV et EBV) dans la
survenue d'une ulcération génitale chez des femmes
coïnfectées par le VIH-1 et le HSV-2 dans la ville
de Bobo-Dioulasso**

Mémoire

Présenté et soutenu publiquement le **27 avril 2015**

Pour l'obtention du **Master en Biologie Appliquée et Modélisation des
Systèmes Biologiques (BAMSB)**

Par

BAZIE Wilfried Wenceslas, titulaire d'un doctorat d'Etat en Médecine Humaine

JURY

Directeur de mémoire

Pr Jean-Bosco OUEDRAOGO

Président : Pr Adrien M.G. BELEM

Co-Directrice de mémoire

Dr Diane Célestine VALEA

Membres : Dr Juliette TRANCHOT/ DIALLO

Dr Diane Célestine VALEA

BURKINA FASO

UNITE – PROGRES – JUSTICE

MINISTERE DES ENSEIGNEMENTS SECONDAIRE ET SUPERIEUR

UNIVERSITE POLYTECHNIQUE DE BOBO-DIOULASSO (UPB)

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES NATURELLES ET AGRONOMIQUES



Année Universitaire : 2014 - 2015

**Place des herpès virus (HSV-2, CMV et EBV) dans la
survenue d'une ulcération génitale chez des femmes
coïnfectées par le VIH-1 et le HSV-2 dans la ville
de Bobo-Dioulasso**

Mémoire

Présenté et soutenu publiquement le **27 avril 2015**

Pour l'obtention du **Master en Biologie Appliquée et Modélisation des
Systèmes Biologiques (BAMSB)**

Par

BAZIE Wilfried Wenceslas, titulaire d'un doctorat d'Etat en Médecine Humaine

JURY

Directeur de mémoire

Pr Jean-Bosco OUEDRAOGO

Président : Pr Adrien M.G. BELEM

Co-Directrice de mémoire

Dr Diane Célestine VALEA

Membres : Dr Juliette TRANCHOT/ DIALLO

Dr Diane Célestine VALEA

DEDICACES

Je dédie ce mémoire :

- A mes parents, beaux-parents et frères : merci pour votre soutien inconditionnel et l'amour que vous nous portez ;
- A ma chère épouse et ma fille, pour votre patience et votre compréhension ;
- A tout le personnel du projet Yerelon ;
- Aux participantes de la cohorte Yerelon : puisse ce travail contribuer à l'amélioration de votre prise en charge.

REMERCIEMENTS :

- Au Pr Nicolas MEDA, Directeur Général du Centre MURAZ et coordonnateur Sud du site ANRS Burkina, pour son implication dans la formation des jeunes chercheurs;
- Au Dr Nicolas NAGOT co-investigateur de ces projets, au Pr Vincent FOULONGNE et au Pr Philippe VAN DE PERRE pour leur intervention dans la réalisation de ce travail;
- Au Centre MURAZ et à la Coordination du projet Yerelon pour leur soutien dans la réalisation de nos travaux de mémoire ;
- Au personnel du Laboratoire Mixte de Biologie Moléculaire du Centre MURAZ pour le travail abattu ;
- Aux Dr Issouf KONATE et Dr Isidore TRAORE : merci pour vos corrections et conseils ;
- Aux Pr Germain SAWADOGO et Dr Adama SOW de l'Ecole Inter-Etats de Sciences Médicales et Vétérinaires de Dakar (EISMV) : merci pour l'accueil et vos corrections ;
- Au Dr Aline OUOBA pour le travail préliminaire abattu ;
- Au Pr Coumba TOURE/KANE et à toute l'équipe de l'Unité de Biologie Moléculaire du service de Bactériologie Virologie du CHU Aristide LE DANTEC, Dakar, SENEGAL : merci pour l'encadrement reçu.
- A mes amis et aînés : Dr Ibrahim SANGARE, Dr Bienvenu SOMDA, Dr Yacouba SOURABIE, Dr Armel SANOU, Dr Soufiane SANOU, Dr Abdoul Salam OUEDRAOGO, Dr Sanata BAMBA, Dr Ollo DA : merci pour vos soutiens multiformes ;
- A mes promotionnaires du Master de Biologie Appliquée : merci pour le temps passé ensemble et pour la collaboration future.

- A notre Maître et Directeur de mémoire,

Pr Jean-Bosco OUEDRAOGO,

Professeur titulaire de Parasitologie,

Enseignant-Chercheur à l'IRSS,

Directeur régional de la recherche scientifique et de l'innovation de la région des Hauts-Bassins.

Cher Maître, vous nous avez fait un immense privilège en acceptant de diriger ce travail malgré vos multiples occupations. Vos qualités pédagogiques et votre rigueur dans le travail resteront pour nous source d'inspiration.

Veillez bien trouver en ce travail notre reconnaissance et notre grande estime.

- A notre Encadreur et Co-Directrice de mémoire,

Dr Diane Célestine VALEA,

Docteur ès Sciences en Bactériologie-Virologie et Hygiène,

Chargée de recherche à l'Institut de Recherche en Sciences de la Santé.

Ce travail est avant tout le vôtre. Vous avez su diriger et suivre ce travail. Votre disponibilité a été permanente et vos conseils éclairés ne nous ont jamais fait défaut. Nous gardons de vous, la rigueur scientifique, l'exigence du travail bien fait et surtout une disponibilité constante qui nous a permis de mener à terme ce travail.

Veillez trouver ici, le témoignage de notre profonde et sincère gratitude pour l'encadrement et les conseils reçus.

- A notre Maître et Président du jury,

Pr Adrien Marie Gaston BELEM

Professeur titulaire en Immuno-parasitologie à l'Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso (UPB).

Nous sommes très marqués de l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury malgré vos multiples sollicitations. Nous saluons votre grande disponibilité vis-à-vis des étudiants. En reconnaissance de votre dévouement à la transmission du savoir, nous vous prions cher maître d'accepter en ce jour, nos sentiments de gratitude et d'hommage.

- A notre Maître et juge

Docteur Juliette DIALLO/TRANCHOT

Maître de conférences en Microbiologie des Universités françaises.

**Maître-assistante en Immunologie Virologie de l'Université Polytechnique de
Bobo-Dioulasso (UPB).**

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail nonobstant vos multiples occupations. Qu'il nous soit permis de vous témoigner notre sincère reconnaissance et notre respectueuse considération.

Table des matières

RESUME :.....	I
ABSTRACT	I
LISTE DES ABREVIATIONS	II
LISTE DES TABLEAUX.....	IV
LISTE DES FIGURES.....	V
INTRODUCTION.....	1
1.Objectifs	4
1.1.Objectif général.....	4
1.2.Objectifs spécifiques.....	4
I.CONTEXTE ET JUSTIFICATION	5
II. GENERALITES	8
II.1. Les herpès virus	9
II.1.1. Herpès simplex virus de type 2 (HSV-2)	9
II.1.2. Le Epstein-Barr virus (EBV).....	13
II.1.3. Cytomégalovirus (CMV).....	17
II.2. les ulcérations génitales (UG).....	22
II.3. Les ulcérations génitales et immunodépression	23
III. MATERIEL ET METHODES	24
III.1. Type et période d'étude.....	25
III.2. Cadre de l'étude	25
III.3. Population de l'étude.....	25
III.4. Echantillonnage et critères d'inclusions.....	26
III.5. Collecte des données	26
III.6. Technique de recueil des échantillons de LCVe	26
III.7. Analyses de laboratoire	27
III.7.1. Sérologie VIH	27
III.7.2. Techniques de détection de l'ADN des herpès virus	27
III.8. Les variables de l'étude.....	29
III.9. Analyses statistiques	30
III.10. Considérations éthiques.....	30
III.11. Définitions Opérationnelles.....	30

III.12. Les limites de l'étude	31
IV. RESULTATS	32
IV.1. Caractéristiques des participantes	33
IV.2. Les ulcérations génitales	35
IV.2.1. Fréquences	35
IV.2.2. Sièges des lésions	35
IV.3. Excrétion génitale du CMV, du EBV et du HSV-2	36
IV.3.1. Répartition des participantes suivant le nombre et le type de virus détectés.....	36
IV.3.2. Répartition des différents virus détectés suivant la phase de l'étude.	37
IV.3.3. Répartition des différents virus détectés suivant la prise du valaciclovir ou du placebo.	37
IV.4. Détection des herpès virus et présence d'une ulcération génitale.....	38
IV.4.1. Détection des herpès virus et présence d'une ulcération génitale à la phase d'observation.....	38
IV.4.2. Détection des herpès virus et présence d'une ulcération génitale à la phase de traitement antiherpétique.	39
IV.5. Impact du traitement antirétroviral sur l'excrétion des herpès virus.	40
IV.5.1. Impact du traitement ARV sur l'excrétion génitale du CMV, du EBV et du HSV-2 durant la phase d'observation.	40
IV.5.2. Impact du traitement ARV sur l'excrétion génitale du CMV, du EBV et du HSV-2 durant la phase de traitement antiherpétique.	41
IV.6. Ulcérations génitales et facteurs associés.....	42
IV.6.1. Survenue d'une ulcération génitale durant la phase d'observation et facteurs associés (analyse univariée).....	42
IV.6.2. Survenue d'une ulcération génitale durant la phase d'observation et facteurs associés (analyse multivariée).....	44
IV.6.3. Survenue d'une ulcération génitale durant la phase de traitement et facteurs associés (analyse univariée).....	44
IV.6.4. Survenue d'une ulcération génitale durant la phase de traitement et facteurs associés (analyse multivariée).....	46
V.DISCUSSION	47
CONCLUSION	51
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	53
ANNEXES	i

RESUME :

Introduction : En plus du virus de l'herpès simplex de type 2 (HSV-2), d'autres herpes virus humains notamment le virus Epstein Barr (EBV), le cytomegalovirus (CMV) sont aussi incriminés dans la survenue des ulcérations génitales. Cependant, ces virus sont rarement recherchés en pratique courante. **Objectif :** Explorer la relation entre le portage génital des herpes virus (HSV-2, CMV, EBV) et la survenue des ulcérations génitales chez des femmes coinfectedes par le VIH-1 et HSV-2. **Matériel-Méthodes :** Etude de cohorte nichée dans un essai thérapeutique. A chaque visite, un examen gynécologique à la recherche des ulcérations génitales et un prélèvement des sécrétions génitales par lavage cervico-vaginal enrichi d'un écouvillon cervical (LCVe) étaient pratiqués. Extraction (QIAGEN) de l'ADN des virus du LCVe suivie d'amplification (TaqMan). **Résultats :** L'âge médian des 194 participantes était de 32 ans et 30,4 % étaient sous traitement antirétroviraux. 32,5 % ont présentés au moins un épisode d'ulcération génitale durant le suivi. Le HSV-2, le CMV et le EBV ont été détecté chez 92% des participantes. L'excrétion génitale du HSV2 (OR= 5,63 IC95% [2,22 - 14,28] p= 0,000) et du EBV (OR= 3,90, IC95% [1,28-11,84] p= 0,016) augmentaient le risque de survenue d'une ulcération génitale ce qui ne s'est pas vérifié pour le CMV. **Conclusion :** Le EBV doit être pris en compte dans le diagnostic étiologique d'une ulcération génitale.

Mots clés : CMV, EBV, HSV-2, Ulcération génitale, Excrétion génitale.

ABSTRACT

Introduction: Besides herpes simplex virus type 2 (HSV-2), other human herpes viruses including Epstein Barr virus (EBV) and cytomegalovirus (CMV) are also implicated in genital ulcers arisen. However, these viruses are rarely search in current practice. **Objective:** To explore the relationship between genital shedding of herpes virus (HSV-2, CMV, EBV) and genital ulcers arise in HIV-1 and HSV-2 coinfectes women. **Material-Methods:** A nested cohort study in a clinical trial was perform. At each visit, gynecological examination for genital ulcers and a sample of cervicovaginal lavage enriched (CVLe) by cervical swabbling were realized. Amplification (TaqMan) of virus DNA extrated (QIAGEN) to CVLe. **Results:** The median age of 194 participants was 32 years and 30.4% were on antiretroviral treatment. During the follow up, 32.5 % have reported at least one episode of genital ulcer. HSV-2, CMV and EBV were detected in 92% of participants. Genital shedding of HSV-2 (OR = 5.63 IC 95% [2.22 to 14.28] p = 0.000) and EBV (OR = 3.90 IC 95% [1.28 to 11.84] p = 0.016) increased the risk of genital ulcer occurrence that was not confirm for CMV. **Conclusion:** EBV must be consider in the etiological diagnosis of genital ulceration.

Keywords: CMV, EBV, HSV-2, genital ulceration, genital shedding

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac : Anticorps
ACV : Aciclovir
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ANRS : Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les Hépatites Virales (France)
CMV : Cytomégalovirus
dNTPs : Désoxyribonucléotide TriPhosphates
EBV : EPSTEIN-BARR virus
ELISA: Enzym Linked ImmunoSorbent Assay
HHV: Human Herpes Virus
HHV-1: Human Herpes Virus type 1
HHV-2: Human Herpes Virus type 2
HHV-3: Human Herpes Virus type 3
HHV-4: Human Herpes Virus type 4
HHV-5: Human Herpes Virus type 5
HHV-6: Human Herpes Virus type 6
HHV-7: Human Herpes Virus type 7
HHV-8: Human Herpes Virus type 8
HPV: Human papilloma virus
HSV-1: Herpès simplex virus type 1
HSV-2: Herpès Simplex Virus type 2
IF: Immunofluorescence
IgA : Immunoglobuline de type A
IgG : Immunoglobuline de type G
IgM : Immunoglobuline de type M
IST : Infection sexuellement transmissible
LCV : Liquide de lavage cervico-vaginal
LCVe : Liquide de lavage cervico-vaginal enrichi
MNI: Mono Nucléose Infectieuse
NGF: Nerve Growth Factor
OMS: Organisation Mondiale de la Santé
Pb : Paire de bases
PCR : Polymerase Chain Reaction (Reaction de polymérisation en chaine)

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

UG : Ulcération génitale

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VIH-1 : Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1

VZV : Virus varicelle zona

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Caractéristiques sociodémographique, cliniques, thérapeutiques et biologiques des participantes à l'inclusion.....	34
Tableau II: Association entre la présence d'une ulcération génitale et les caractéristiques des participantes à la phase d'observation (résultats de la régression logistique univariée).....	43
Tableau III: Association entre la présence d'une ulcération génitale et les caractéristiques des participantes à la phase d'observation (résultats de la régression logistique multivariée).....	44
Tableau IV : Association entre la présence d'une ulcération génitale et les caractéristiques des participantes à la phase de traitement antiherpétique (résultats de la régression logistique univariée).....	45
Tableau V: Association entre la présence d'une ulcération génitale et les caractéristiques des participantes à la phase de traitement antiherpétique (résultats de la régression logistique multivariée).	46

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Structure du virus herpès simplex.....	10
Figure 2: Coupe et schéma du virus Epstein-Barr.....	14
Figure 3:Schéma de la structure du cytomégalovirus	18
Figure 4: Principe de la PCR en temps réel	29
Figure 5: répartition des participantes selon le nombre total d'épisodes d'ulcérations génitales observés au cours du suivi.....	35
Figure 6: répartition des épisodes d'ulcérations génitales survenues au cours du suivi, selon le siège de la lésion.	36
Figure 7: Répartition des participantes suivant le nombre et le type de virus détectés.....	36
Figure 8: Répartition des virus détectés dans le LCVe suivant la phase de l'étude.....	37
Figure 9: Répartition des virus détectés dans le LCVe suivant la prise ou non du Valaciclovir.	38
Figure 10: Proportions de détection des herpès virus suivant la présence ou l'absence d'une ulcération génitale durant la phase d'observation.	39
Figure 11: Proportions de détection des herpès virus suivant la présence ou l'absence d'une ulcération génitale à la phase de traitement antiherpétique.....	40
Figure 12: Excrétion du CMV, du EBV et du HSV-2 suivant la prise ou non d'un traitement antirétroviral en phase d'observation.	41
Figure 13: Excrétion du CMV, du EBV et du HSV-2 suivant la prise ou non d'un traitement antirétroviral en phase de traitement antiherpétique.	42

INTRODUCTION

Les herpès virus sont des virus ubiquitaires qui appartiennent à la famille des *Herpesviridae*. Cette famille regroupe plus de 120 virus infectants les animaux ou les êtres humains (Davison et al., 2009). Dans cette famille de virus, huit sont strictement humains et sont regroupés sous l'appellation Herpès Virus Humains ou «Human Herpes Virus» (HHV). Il s'agit de l'herpès simplex virus type 1 et 2 (HSV-1 et HSV-2), du virus de la varicelle et du zona (VZV ou herpès virus humain de type 3), virus Epstein-Barr (EBV ou herpès virus humain de type 4), du cytomégalovirus (CMV ou herpès virus humain de type 5), des herpès virus humains de type 6 (HHV-6), 7 (HHV-7) et 8 (HHV-8) (Davison et al., 2009).

Généralement bénignes, les infections par ces virus se signalent par leur forte prévalence voir leur mortalité dans différents groupes de patients : aux âges extrêmes de la vie, au cours des grossesses, chez les patients immunodéprimés (maladies hématologiques, sujets transplantés ou atteints par le SIDA) (Gallant et al., 1992 ; Fry, 2001 ; White et al., 2012). Ces virus sont responsables de nombreuses maladies avec des manifestations cutanéomuqueuses et sont impliqués dans la survenue de nombreux cancers (Nicholas, 2000 ; Lepiller et al., 2012). Certains de ces virus notamment le HSV-2, le CMV et le EBV sont aussi incriminés comme étant des infections sexuellement transmissibles se manifestants sous forme d'ulcérations génitales (UG) (Davison, 2011).

Le diagnostic de laboratoire de ces infections virales responsables d'ulcérations génitales n'est pas toujours aisé. Traditionnellement il est basé sur la détection des antigènes ou des anticorps et l'isolement des virus en culture cellulaire. Avec les récents progrès techniques, la détection et la quantification du génome viral par les techniques de Polymerase Chain Reaction (PCR) ont amélioré le diagnostic de ces infections avec l'avantage d'être plus sensibles, rapides et un moindre risque de contamination des échantillons (Hudnall et al., 2011).

La présente étude vise à évaluer l'étiologie herpétique des ulcérations génitales en recherchant le CMV, le EBV et le HSV-2 dans les sécrétions génitales des participantes coinfectedes par le HSV-2 et le VIH-1 et suivies dans le cadre du programme de recherche Yerelon (Cohorte de l'Agence française de Recherches sur le Sida et les hépatites virales (ANRS) 1222) et des études annexées (ANRS 1285 et 12205).

Le Programme ANRS 1222 « Yerelon » (ce qui signifie « apprendre à se connaître » en langue vernaculaire dioula) a été mis en œuvre en 1998 à Bobo-Dioulasso pour améliorer la santé des femmes impliquées dans le commerce du sexe, à travers une intervention adaptée de prévention et de prise en charge des Infections Sexuellement Transmises (IST) et du Virus de

Immunodéficience Humaine (VIH). Ce programme de recherche, financé par l'Agence française de Recherches sur le Sida et les hépatites virales, a validé et mis en place un paquet d'intervention. Ce paquet d'intervention mise en œuvre dans les deux grandes villes du Burkina, a permis de : décrire les catégories socioprofessionnelles de femmes impliquées dans le travail du sexe (TS); décrire la prévalence et l'incidence du VIH dans ces groupes ; démontrer la faisabilité de l'introduction et les conditions de l'obtention d'un bon taux d'efficacité des traitements antirétroviraux (ARV) dans ce groupe.

En outre, les taux de rétention des TS dans l'intervention étaient très élevés et l'intervention a permis un renforcement des capacités locales à travers : l'acquisition dans les deux plus grandes villes du Burkina de deux cliniques de soins dédiées aux TS et intégrées dans des Centres de santé publics ; et la formation d'une équipe pluridisciplinaire (médecins, psychologue, assistante sociales, pairs éducatrices) animant ces cliniques.

Objectifs

1.1. Objectif général.

Explorer la relation entre le portage génital des herpès virus (le HSV-2, le CMV et le EBV) et la survenue d'une ulcération génitale chez les femmes de la cohorte Yerelon coinfectées par le VIH-1 et le HSV-2.

1.2. Objectifs spécifiques

- Décrire les caractéristiques des participantes à l'inclusion dans l'étude ;
- Décrire les caractéristiques cliniques des ulcérations génitales observées durant le suivi ;
- Déterminer la proportion des femmes excréant le HSV-2, le CMV et le EBV dans le liquide de lavage cervico-vaginal durant le suivi ;
- Identifier les facteurs associés à la survenue d'une ulcération génitale durant le suivi ;
- Déterminer l'impact du traitement antirétroviral et du traitement anti herpétique (valaciclovir) sur la survenue des UG et l'excrétion génitale du HSV-2, du CMV et du EBV durant le suivi.

I- Contexte et justification

Avec l'avènement de la pandémie de l'infection à VIH et l'utilisation abusive des antibiotiques (traitement syndromique des IST, automédication) nous assistons à une diminution des étiologies bactériennes des ulcérations génitales et à l'émergence des étiologies virales (OMS, 2007). C'est ainsi que l'herpès génital, causé principalement par l'infection à Herpès simplex virus de type 2 (HSV-2), est devenu la première cause d'ulcération génitale en Afrique (O'Farrell, 1999; OMS, 2007). Cette infection virale chronique, caractérisée par des épisodes de réactivations virales symptomatiques ou non, fait l'objet d'un net regain d'intérêt en raison de ses interactions avec le VIH-1 (OMS, 2007 ; Kalichman et al., 2011). Aussi, des études portant sur la recherche étiologique des ulcérations génitales en tenant compte des causes les plus fréquentes montrent que entre 30 à 40% des ulcérations génitales restent sans étiologie (Behets et al., 1999 ; Risbud et al., 1999 ; Hope-Rapp et al., 2010).

En plus du HSV-2, d'autres herpès virus humains notamment le CMV et le EBV de par leur tropisme cutanéomuqueux sont aussi incriminés dans la survenue de lésions cutanées et muqueuses (vésicules et d'ulcérations) siégeant dans la sphère génitale, buccale et anale. Des études portant sur des séries de cas ont confirmées le rôle de ces deux virus dans la survenue d'ulcérations génitales et sont considérés comme d'importantes causes d'ulcération génitale (Dauden et al., 2001 ; Sewell et Anderson, 2001 ; Halvorsen et al., 2006 ; Jerdan et al., 2013).

Cependant, malgré la mise en cause du CMV et du EBV dans les ulcérations génitales, ces agents sont rarement recherchés en pratique courante. Cette recherche non systématique s'explique par la difficulté de mise en évidence de ces virus et aussi par la difficulté d'établir leur rôle pathogénique dans la genèse des lésions (Dauden et al., 2001 ; Sewell et Anderson, 2001 ; Halvorsen et al., 2006 ; Jerdan et al., 2013).

Ces dernières années la mise au point de techniques de diagnostics moléculaires plus performantes et plus spécifiques telles les techniques de PCR en temps réel ont permis d'améliorer le diagnostic et la prise en charge des infections à herpès virus en permettant non seulement la détection mais aussi la quantification des virus dans les liquides biologiques. La fréquence de l'excrétion cervico-vaginale de ces virus fait des secrétions vaginales un spécimen de prédilection pour la recherche (Aryee et al., 2005 ; Strick et Wald 2006 ; Ross et al., 2011 ; Binnicker et Espy, 2013).

Au Burkina Faso et à Bobo-Dioulasso, des essais cliniques portant sur l'interaction entre HSV-2 et le VIH-1 ont été réalisés sur une cohorte de femmes coinfectées par le VIH-1 et HSV-2. Ces essais cliniques avaient pour but de démontrer le lien de causalité entre infection à HSV-2 et

la majoration de la réplication du VIH-1, en supprimant le facteur herpès par un traitement antiherpétique au long cours (le valaciclovir), et en comparant le portage génital du VIH-1 et la charge virale VIH-1 plasmatique à un groupe placebo. Les résultats ont mis en évidence une baisse significative de la fréquence du portage génital et de la charge virale génitale VIH-1 ; un impact indirect positif du valaciclovir sur la réplication génitale du VIH chez les femmes qui présentent toujours un portage VIH-1 sous ARV (Ouedraogo et al., 2006 ; Nagot et al., 2007).

C'est dans ce contexte de diagnostic étiologique difficile des ulcérations génitales, d'émergence des étiologies virales et d'utilisation de nouveaux outils de diagnostic, que nous avons initié cette étude portant sur la place des herpès virus (HSV-2, CMV et EBV) dans la survenue d'une ulcération génitale chez des femmes coinfectedées par le VIH-1 et le HSV-2 dans la ville de Bobo-Dioulasso. Elle permettra d'explorer l'étiologie herpétique des ulcérations génitales en recherchant la présence du HSV-2, du CMV et du EBV dans le liquide de lavage cervico-vaginal chez des femmes coinfectedées par le VIH-1 et le HSV-2 et suivi dans le cadre des études ANRS 1285 et 12205.

L'utilisation du lavage Cervico-vaginal enrichi (LCVe) dans cette étude se justifie par la fréquence de l'excrétion génitale de ces virus. L'ADN du CMV est détecté dans les sécrétions génitales de 50 à 66 % des femmes infectées (Mostad et al., 1999 ; Slyker et al., 2014). Une excrétion génitale du EBV au niveau cervical peut être détectée chez près de 20 à 40% de femmes en bonne santé infectées par ce virus (Gradilone et al., 1996 ; Perera et al., 2010). Quant au HSV-2, il est détecté dans les sécrétions génitales de 37 à 50% des femmes infectées par ce virus (Koelle et Wald, 2000 ; LeGoff et al., 2007).

II- GENERALITES

II.1. Les herpès virus

Les herpès virus sont des virus ubiquitaires dont la dissémination est endémique dans de nombreuses régions du monde. Ces virus ont en commun une structure identique et possèdent une étroite spécificité d'espèce. L'infection dans l'organisme se fait en 3 étapes : la primo-infection symptomatique ou non, l'infection latente et l'infection récurrente. Ces infections secondaires assurent aux HHV une persistance dans l'organisme toute la vie. Le contrôle de la réplication des HHV dépend essentiellement de l'immunité cellulaire. L'immunité humorale est d'une importance secondaire, rendant aléatoire la mise au point de vaccins (Hudnall et al., 2011).

Basé sur leurs propriétés biologiques, le regroupement des différents HHV individualise 3 sous-familles : α , β et γ .

- **Les α herpesvirus** : HHV 1, 2 et 3 se répliquent *in vitro* sur de nombreuses lignées cellulaires avec un cycle répliatif court et une rapide diffusion en culture cellulaire (cellules cutaneo-muqueuses et neurones des ganglions sensitifs) (Chen et Hudnall, 2006 ; Berges et Tanner, 2014). Ils induisent une forte lyse cellulaire *in vivo* et les sites de leur infection latente sont les ganglions neuro-sensitifs.

- **Les β herpesvirus** : HHV 5, 6 et 7 se répliquent *in vitro* sur un faible nombre de lignées cellulaires avec un cycle répliatif long et une diffusion lente en culture (cellules épithéliales, lymphocytes T, Monocytes, cellules endothéliales) (Chen et Hudnall, 2006 ; Berges et Tanner, 2014). *In vivo*, leur infection latente siège dans les glandes sécrétoires, le système lymphoréticulaire, les cellules épithéliales des différents tissus.

- **Les γ herpesvirus** : HHV 4 et 8 se répliquent *in vitro* sur cellules lymphoblastoïdes. *In vivo*, ils infectent les lymphocytes B ou T où ils induisent des infections latentes ou lytiques. HHV4 infecte également les cellules épithéliales ou fibroblastiques (Chen et Hudnall, 2006 ; Berges et Tanner, 2014).

II.1.1. Herpès simplex virus de type 2 (HSV-2)

II.1.1.1. Définition

Le virus Herpès simplex de type 2 appartient à la famille des *Herpesviridae* qui ont en commun une propriété biologique remarquable, celle d'établir un état de latence dans l'organisme. Ce sont des virus à acide désoxyribonucléique (ADN) classés dans la sous-famille des *alphaherpesvirinae* (cycle de réplication rapide, tropisme et siège de latence neuronal) (Laurent, 2002).

II.1.1.2. Structure

Les particules virales, d'une taille de 150 à 200 nm, ont une architecture caractéristique et sont constituées d'un génome viral fait d'un ADN linéaire double brin de 152 kD contenu dans une capsidie protéique icosaédrique (20 faces) faite de 162 capsomères (figure 1). La capsidie est entourée d'une enveloppe constituée d'un double feuillet lipidique dans laquelle sont insérées des glycoprotéines. Entre la capsidie et l'enveloppe, existe une substance amorphe appelée tégment, essentiellement composée de protéines virales (Rozenberg, 2000 ; Whitley et Roizman, 2001).

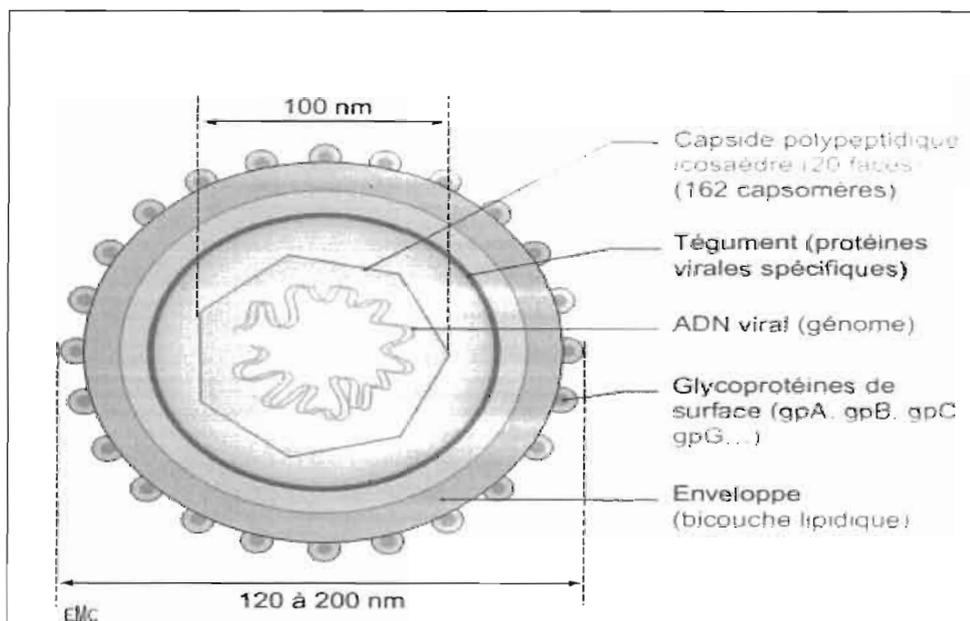


Figure 1: Structure du virus herpès simplex. (Source : Laurent, 2002)

II.1.1.3. Epidémiologie

Le HSV-2 est un agent infectieux très fréquemment rencontré chez l'homme. Il est responsable d'infections ayant des expressions cliniques variables, allant de l'excrétion virale asymptomatique à l'infection généralisée multi viscérale du nouveau-né, en passant par la méningo-encéphalite de l'adulte jeune. Chez le sujet immunodéprimé, les formes cliniques de l'infection herpétique sont souvent graves, avec parfois des récurrences multiples et sévères évoluant sous forme chronique (Hudnall et al., 2011).

Dans la population générale, 60 à 80 % des herpès génitaux (récurrences et primo-infection) sont dus à HSV-2 (Laurent, 2002 ; Hudnall et al., 2011). La transmission de HSV-2 se fait par contact génital (et aussi par contact orogénital). La probabilité de transmission après un contact est inconnue, mais elle est beaucoup plus probable si les symptômes cliniques sont présents, qu'il s'agisse d'une primo-infection ou d'une récurrence. Cependant, l'excrétion virale

asymptomatique est un facteur majeur de transmission de HSV-2. Par ailleurs, 70 % des contagions surviennent en période d'excrétion virale totalement asymptomatique (Laurent, 2002 ; Hudnall et al., 2011).

II.1.1.4. Physiopathologie

Les sites les plus fréquents de l'infection à HSV-2 sont la peau et les muqueuses. La période d'incubation est d'environ 4 jours (2 à 12 jours). Lors d'un premier contact avec HSV-2 (primoinfection symptomatique ou asymptomatique), le virus pénètre la muqueuse génitale (à la faveur d'une microabrasion) à la suite d'un contact direct avec des sécrétions infectées ou avec une surface muqueuse. La première cellule cible de HSV est la cellule épithéliale sur laquelle le virus se fixe et où il se multiplie, conduisant à une dégénérescence ballonnisante, avec lyse des kératinocytes et production de cellules géantes multinucléées syncytiales (Laurent, 2002 ; Hudnall et al., 2011). En même temps se développe une réaction inflammatoire d'abord à polynucléaires, puis lymphocytaire. Très tôt pendant l'infection primaire, les particules virales infectent les terminaisons nerveuses sensibles, et gagnent par voie rétroaxonale le corps neuronal dans le ganglion sensitif ou le ganglion du système nerveux autonome correspondant (Laurent, 2002 ; Hudnall et al., 2011). C'est alors que va s'établir une infection latente, qui commence environ 10 jours après le début de l'infection et va durer toute la vie. Cet état de latence, caractérisé par une persistance du génome viral dans le noyau de certains neurones sous une forme linéaire, non intégrée au génome cellulaire, représente pour le virus un avantage majeur : celui d'échapper à la réponse immune et aux drogues antivirales qui n'agissent que sur la réplication. La réactivation d'une infection ganglionnaire latente est à l'origine des récurrences herpétiques cutanéomuqueuses (Rozenberg, 2000 ; Whitley et Roizman, 2001 ; Laurent, 2002).

II.1.1.5. Réplication et latence

Une réplication virale à bas bruit dans un très faible nombre de neurones pourrait suffire à entraîner une réactivation clinique, et des facteurs spécifiques neuronaux pourraient aussi être responsables de la réactivation virale (NGF (nerve growth factor), protéine oct-2). La migration du virus le long de l'axone, et sa réplication au niveau de la peau ou de la muqueuse, produisent des lésions vésiculopustuleuses : c'est l'herpès récurrent, siégeant toujours au même endroit ou dans une région proche (Laurent, 2002 ; Hudnall et al., 2011). Ces récurrences sont souvent déclenchées par la fièvre, une maladie infectieuse, le stress, le soleil, un traumatisme, des facteurs hormonaux et cela en l'absence d'un nouveau contage (Laurent, 2002).

II.1.1.6. Diagnostic biologique

- **Détection des antigènes viraux** : Depuis l'avènement des anticorps monoclonaux, de nombreuses méthodes spécifiques, rapides et faciles à réaliser, ont été développées pour la détection des antigènes des HSV. La plus ancienne est l'immunofluorescence (IF) effectuée sur un frottis des cellules de la base de la vésicule herpétique ou sur le culot cellulaire obtenu après avoir déchargé l'écouvillon dans le milieu de transport.

Les méthodes immuno-enzymatiques (ELISA) de détection d'antigène appliquées aux HSV ont l'avantage d'être automatisables, mais elles ont un prix de revient plus élevé que l'IF, surtout pour des recherches ponctuelles (Thouvenot et al., 1998).

- **Isolement en culture et identification des virus** : C'est la méthode de référence apportant la certitude du diagnostic. Après mise en culture sur cellules diploïdes humaines, MRC-5, les plus couramment utilisées, les virus se multiplient rapidement, et on observe un effet cytopathogène après 1 à 4 jours d'incubation à 36°C. L'identification et le typage sont réalisés à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques à HSV-2 (Gleaves et al., 1985).

- **Détection du génome viral** : la PCR est très utile, voire actuellement indispensable, pour le diagnostic des infections à HSV. De nombreuses régions cibles peuvent être amplifiées telles que les gènes codant pour l'ADN polymérase, la thymidine kinase, la glycoprotéine B, la glycoprotéine D et la glycoprotéine G. Elle est aussi très utile pour détecter une excrétion virale asymptomatique. (Thouvenot et al., 1998 ; Strick et al., 2006).

- **Sérologies herpétiques spécifiques** : La valeur et l'intérêt diagnostiques des sérologies herpétiques spécifiques de type ne sont pas encore définis. Une séropositivité à HSV-2, marqueur d'une infection latente, peut se révéler utile dans certaines formes atypiques d'herpès génital (culture virale négative). La sérologie HSV-2 peut aussi apporter des renseignements utiles chez les couples sérodifférents et chez la femme enceinte, pour apprécier au mieux les risques d'herpès néonatal (Munday et al., 2001).

II.1.1.7. Traitement- Prévention

La découverte de l'activité antiherpétique de l'aciclovir (ACV) date de 1977 et a valu à Gertrude B Elion et Georges Hitchings, entre autres travaux, le prix Nobel de médecine et de physiologie en 1988. L'acycloguanosine, la molécule qui est un analogue nucléosidique original, est le prototype de la molécule antivirale efficace spécifique et peu toxique (Chastel, 2000; Hasegawa et al., 2001). L'ACV, en tant qu'inhibiteur de la réplication de l'ADN viral, n'a pas d'action sur les virus latents dans les ganglions sensitifs, puisque leur ADN ne se réplique pas. Ainsi, l'ACV

n'éradique pas l'infection, de sorte que les poussées sont simplement suspendues et reviennent à l'arrêt du traitement.

L'ACV, le valaciclovir, le famciclovir par voie orale ont prouvé leur efficacité dans la prévention des récurrences herpétiques. Les récurrences d'herpès génital sont réduites de 80 %, et le traitement prévient les récurrences chez 25 à 30 % des patients (Whitley et Roizman, 2001).

Un dérivé de pyrophosphate, l'acide phosphonoformique ou foscarnet (Foscavir[®]), est utilisé quand le virus est résistant à l'ACV en particulier chez les patients infectés par le VIH traités au long cours pour des herpès chroniques (Laurent, 2002).

II.1.2. Le Epstein-Barr virus (EBV)

II.1.2.1. Définition

Le virus Epstein-Barr (EBV) ou human herpes virus de type 4 (HHV-4) appartient à la famille des *Herpesviridae* humains, à la sous-famille des *Gammaherpesvirinae*, au genre des *Lymphocryptovirus* (virus caché dans les lymphocytes). Il a été découvert en 1964 et nommé ainsi en l'honneur de Michael Anthony Epstein et de son étudiante Yvonne Barr, il cause plusieurs maladies dont la mononucléose infectieuse (MNI), le lymphome de Burkitt. Le EBV est caractérisé par sa capacité à persister de façon silencieuse chez le sujet sain et par son association à des manifestations pathologiques protéiformes (Hudnall et al., 2011 ; Seigneurin, 2001).

II.1.2.2. Structure

C'est un virus d'environ 150 nm de diamètre, pourvu d'une capsidie protéique icosaédrique et d'une enveloppe phospholipidique rendant compte de sa fragilité dans le milieu extérieur (figure 2). Le génome est constitué d'une molécule d'ADN linéaire double brin, de quelques 172 Kpb. Il possède une nucléocapsidie icosaédrique contenant 162 capsomères, une protéine d'enveloppe amorphe entourant la capsidie et une protéine d'enveloppe externe constituée par une glycoprotéine unique (Straus et al., 1993 ; Cohen, 2000 ; Stephan et al., 2000). Le génome encode environ pour 100 gènes dont certains sont exprimés lors de la phase de latence du virus ; ce sont : EBNA (Epstein-Barr nuclear antigen) 1, 2 et 3, EBNA-LP, LMP (Latent membrane protein)-1, LMP-2, EBER (Epstein Barr encoded small RNAs) -1 et EBER-2 (Cohen, 2000 ; Stephan et al, 2000). Ainsi :

- EBNA-1 assure le maintien du génome viral et coordonne la réplication de l'épisome lors de la division cellulaire.

- EBNA-2 est essentiel à l'expression des protéines EBNA-1 et EBNA-3 et au processus d'immortalisation des lymphocytes B. Il transactive l'expression du marqueur d'activation CD23 du lymphocyte B et régule positivement l'expression du récepteur CD21 du virus, c-fgr et les gènes de latence LMP-1 et LMP-2.
- EBNA-3 est très polymorphique et diffère selon le type de virus. Il est constitué d'une famille de 3 gènes (EBNA-3A, EBNA-3B et EBNA-3C) de haut poids moléculaire localisé en tandem sur le génome du virus Epstein-Barr.
- EBNA-LP est un ensemble de protéines extrêmement polymorphiques. Cependant la fonction d'EBNA-LP demeure floue, elle pourrait jouer un rôle dans le traitement de l'ARN ou être associée avec certaines protéines de régulation nucléaire.
- LMP 1 est exprimé en absence d'EBNA-2 pendant l'activation du cycle lytique des lymphocytes B. Cette protéine protège les lymphocytes B infectés de l'apoptose en partie par l'activation de l'oncogène bcl-2. De plus, l'action de transformation de LMP-1 semble impliquer les protéines de signalisation de TRAF (tumor necrosis factor receptor-associated factors)
- LMP-2 est une protéine de membrane contenant 12 domaines transmembranaires hydrophobiques qui sont localisés avec LMP-1 dans la membrane plasmique des lymphocytes infectés.
- EBER-1 et EBER-2 sont les ARN du virus Epstein-Barr les plus abondants durant la latence des cellules B infectées. Ces petits ARN sont codés sous forme non polyadénylé. La majorité des EBER est localisé dans le noyau où ils sont complexés avec la protéine.

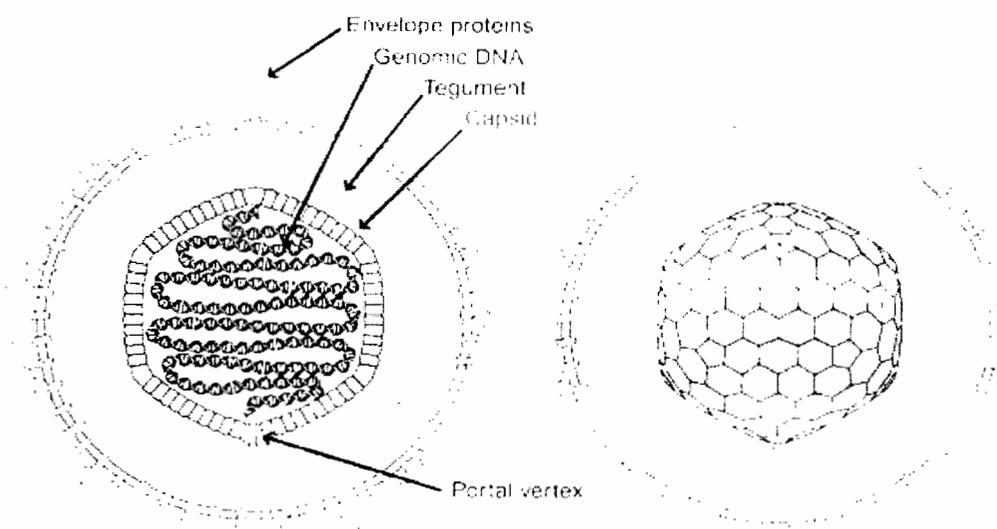


Figure 2: Coupe et schéma du virus Epstein-Barr

(Source: WWW.cullenlab.duhs.duke.edu/research.cbv/)

II.1.2.3. Épidémiologie

Le EBV est un virus ubiquitaire. Les études de séroprévalence montrent que le virus infecte au moins 95 % de la population mondiale. Il cause plusieurs maladies de prédominance variable au monde. Celles-ci traduisent l'intensité des réponses immunes de l'hôte, comme dans la mononucléose infectieuse qui correspond à une primo-infection symptomatique, ou le pouvoir transformant du virus s'exprimant alors dans un cadre géo-épidémiologique particulier (lymphome de Burkitt, carcinome du nasopharynx) ou dans celui d'un déficit immunitaire cellulaire sévère. Sur le plan mondial, deux types de virus sont observés, EBV-1 et EBV-2 (ou bien type A et type B). Les études séro-épidémiologiques et l'isolation du virus suggèrent que le type B est principalement restreint à l'Afrique contrairement au type A retrouvé en Europe et en Amérique du Nord (Cohen, 2000 ; Hudnall et al., 2011).

II.1.2.4. Physiopathologie

Transmis par la salive, la transfusion de produits sanguins, le don d'organe ou de tissus, le lait maternel et les rapports sexuels, le EBV a un réservoir strictement humain (Naher et al., 1992 ; Ranjit et al., 2006).

Le site primaire de l'infection à EBV se trouve dans l'oropharynx, où les lymphocytes B du tissu lymphoïde local sont infectés. Le virus se réplique et infecte accidentellement les cellules épithéliales différenciées du voisinage. Après la primo-infection, il s'établit un équilibre remarquable entre le virus qui souhaite persister dans l'organisme et l'élimination des cellules infectées par les défenses immunitaires. Les lymphocytes B quiescents du sang périphérique, les cellules B-mémoire, sont probablement le principal site de persistance du EBV. Le sujet immunocompétent maintient une délicate balance entre la prolifération des lymphocytes B infectés de façon latente et la réponse immunitaire. L'équilibre se rompt en cas d'altération de cette réponse immunitaire cellulaire (Babcock et al., 1998 ; Hudnall et al., 2011).

Au cours de l'immunodépression, les modifications des réponses T cytotoxiques laissent libre l'expansion des cellules exprimant le programme de croissance. Ces dernières, immortalisées, constituent une cible importante pour des altérations génétiques secondaires : la cellule ainsi transformée, à croissance non contrôlée, peut se développer et donner naissance à une lymphoprolifération et à un lymphome (Liebowitz, 1998 ; Hudnall et al., 2011).

II.1.2.5. Réplication et latence

Les mécanismes d'activation virale à partir de l'infection latente ont été beaucoup étudiés dans les lignées lymphoïdes cultivées in vitro. L'activateur transcriptionnel ZFBRV (Z-Factor B virus Réplication Activator) augmente la transcription des gènes « lytiques », inhibe les synthèses

d'ADN cellulaire, réprime les promoteurs associés à la latence et reconnaît l'origine de la réplication lytique. Cette protéine pourrait être apportée in vivo lors de la surinfection par une autre souche du EBV (Straus et al., 1993 ; Seigneurin, 2001). Chez le sujet EBV positif immunocompétent, le EBV est réactivé périodiquement dans l'oropharynx, et de petites quantités de virus infectieux doivent être produites épisodiquement par des cellules épithéliales (voies génitales) ou des lymphocytes B (tissus lymphoïdes profonds, sang circulant). Mais cette réplication virale n'entraîne pas d'altérations tissulaires suffisantes pour provoquer des signes cliniques. Chez le malade immunodéprimé, après transplantation ou au cours du syndrome d'immunodéficience acquise (sida), cette réactivation, qui survient plus fréquemment, est amplifiée quantitativement (Straus et al., 1993 ; Seigneurin, 2001).

II.1.2.6. Diagnostic biologique

On peut schématiquement regrouper les indications du diagnostic virologique de l'infection à EBV dans quatre catégories. La première, dans un contexte d'infection aiguë, la MNI et plus généralement la primo-infection à EBV. L'infection « chronique » à EBV est représentée surtout par les cancers associés au virus chez le sujet immunocompétent (lymphome de Burkitt, carcinome du nasopharynx) et constitue la deuxième catégorie d'indication de diagnostic. Le troisième groupe d'indications concerne le sujet immunodéprimé chez qui la réactivation virale conduit dans certains cas à une lymphoprolifération qu'il faut prévoir, diagnostiquer et suivre. Enfin, le dépistage de l'infection à EBV est indiqué lors du don de certains tissus ou organes, dans un contexte plus général de transmission d'une souche virale d'un donneur à un receveur. Selon ces différents contextes, l'exploration utilise plutôt tel ou tel type de méthode ou de marqueur.

- Mise en évidence de marqueurs moléculaires ou d'antigènes du EBV : L'hybridation in situ permet de mettre en évidence de petits ARN codés par le EBV (EBER's) dans les cellules chroniquement infectées. Des anticorps monoclonaux marqués (fluorescence ou peroxydase) sont utilisés pour localiser certaines protéines produites par le EBV. Ces techniques sont employées essentiellement pour l'étude des tissus tumoraux (Seigneurin, 2001 ;Seigneurin et al., 2006).

- Détection du génome viral : La PCR est la technique actuellement la plus utilisée pour mettre en évidence le génome du EBV et surtout pour la quantification de la charge virale (Brenzel-Pesce et al., 2002).

- **Isolement viral:** L'isolement du EBV n'est réalisable que sur lymphocytes B isolés du sang de cordon, mais les techniques de culture, longues et fastidieuses, ne permettent pas de faire du diagnostic de routine (Seigneurin, 2001 ; Seigneurin et al., 2006).

- **Détection des anticorps hétérophiles:** L'infection des lymphocytes B par le EBV entraîne une stimulation de la production d'anticorps (Ac) non spécifiques de type IgM, appelés Ac hétérophiles. Dans la MNI, ces Ac sont capables d'agglutiner les hématies de certaines espèces animales (le MNI test (Mono-Spot), la réaction de Paul-Bunnell-Davidsohn) (Seigneurin, 2001 ; Seigneurin et al., 2006 ; Hudnall et al., 2011).

- **Détection des Ac spécifiques anti-EBV :** par immunofluorescence indirecte (méthode de référence), par technique ELISA ou par immunoblot pour détecter les anticorps IgG anti-EBNA et anti-VCA, ainsi que les IgM anti-VCA (Seigneurin, 2001 ; Seigneurin et al., 2006; Hudnall et al., 2011).

II.1.2.7. Traitement – Prévention

Il n'existe pas encore de vaccin disponible contre le EBV ni de médicament antiviral actif sur le EBV (Hudnall et al., 2011).

II.1.3. Cytomégalovirus (CMV)

II.1.3.1. Définition

Le CMV ou Human herpes virus 5 (HHV-5) appartient la famille des herpes virus humains et à la sous-famille des *betaherpesvirinae*. Ce virus a été isolé pour la première fois en 1956 à partir de cultures de cellules fibroblastiques humaines (Birdsong et al., 1956). C'est un virus aux multiples facettes doté des plus grandes capacités d'immunosubversion (Weller, 1971 ; Drouot et al., 2002). L'équilibre qui s'établit ainsi entre lui et l'homme reste cependant précaire, et la survenue d'une immunodéficience expose au risque d'atteintes tissulaires potentiellement létales.

II.1.3.2. Structure

Le cytomégalovirus est le plus gros des herpès virus connu avec un diamètre de 105 nm. Le génome est constitué d'un ADN double brin de 240 Kpb enfermé dans une capsidie icosaédrique constituée de deux protéines (figure 3) : la protéine majeure (MCP) et la protéine mineure (mCP). La capsidie est entourée d'un tégument (ou matrice) composé d'une vingtaine de phosphoprotéines dont la phosphoprotéine 65 (pp65) qui représente 95 %. L'enveloppe virale est composée d'une bicouche lipidique portant des glycoprotéines dont la principale est la glycoprotéine B (gB) (Chen et al., 1999 ; Gandhi et Khanna, 2004).

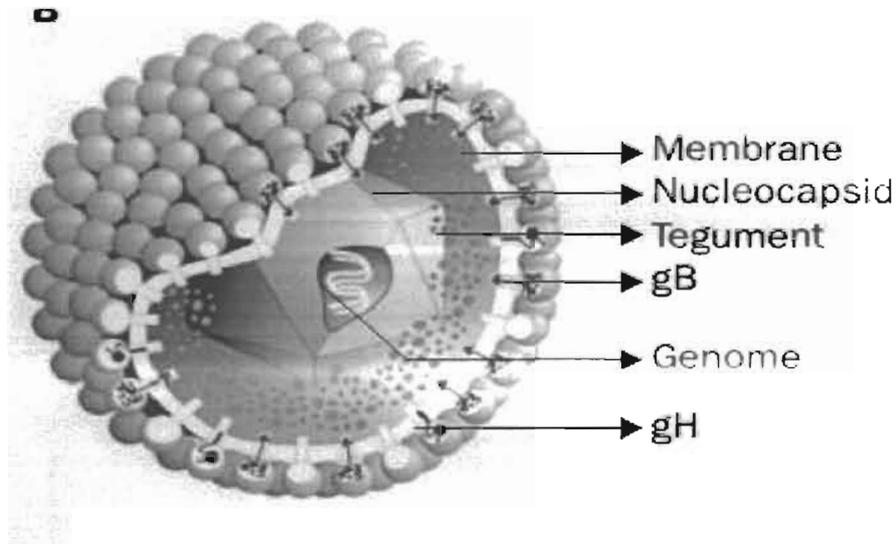


Figure 3:Schéma de la structure du cytomégalovirus (Source:Gandhi et Khanna, 2004)

II.1.3.3. Epidémiologie

Le cytomégalovirus humain est un virus ubiquitaire et environ 40 % à 100 % des personnes sont infectées par ce virus (Cannon et al., 2010 ; Hudnall et al., 2011). La séroprévalence suit une distribution bimodale avec un premier pic pendant la petite enfance et un second chez le jeune adulte. Le premier résulte d'une part de la transmission verticale du virus, l'infection à CMV restant actuellement la première cause d'infection congénitale d'origine virale dans le monde avec 0,3 à 1,2% des nouveau-nés vivants (Pass, 2005 ; Cannon et al., 2010). Il résulte aussi de la transmission horizontale, particulièrement fréquente entre enfants, qui excrètent du virus dans la salive, les urines et les sécrétions respiratoires durant une période prolongée. Le second pic varie selon la situation géographique et est probablement dû à une transmission sexuelle (Kuijpers, et al., 2003). Les manifestations cliniques, à l'occasion de la primo-infection ou des infections secondaires, dépendent étroitement de l'état immunitaire de l'hôte. Habituellement inapparentes ou bénignes chez le sujet immunocompétent, elles peuvent être sévères chez le sujet immunodéprimé comme le receveur d'allogreffe et le patient infecté par le VIH, chez le fœtus ou chez le nouveau-né infecté in utero et menacer leur pronostic fonctionnel ou vital (Hudnall et al., 2011).

II.1.3.4. Physiopathologie

Le CMV est un virus lytique qui cause un effet cytopathique avec une ballonnisation des cellules et apparition dans le cytoplasme de corps d'inclusion. Il peut infecter un grand nombre de types cellulaires (cellules endothéliales, épithéliales, fibroblastiques, dendritiques,

macrophagiques, cellules nerveuses, cellules musculaires lisses et hépatocytes) et ainsi être mis en évidence dans la plupart des organes (Birdsong et al., 1956).

Une fois que l'hôte rencontre le virus, il développe une primo-infection qui donne lieu à la dissémination du virus par voie sanguine. Chez un individu immunocompétent, la réponse immunitaire va se mettre en place (humorale mais surtout cellulaire), ce qui va permettre d'éliminer les cellules infectées et stopper la réplication virale. Le virus reste latent et va être capable de se réactiver en cas d'immunodépression et de stimulation antigénique d'origine infectieuse et/ou allogénique (transfusion, greffon). Il peut également y avoir une réinfection car l'infection d'un individu par une souche de CMV n'empêche pas une infection par une autre souche. On aura alors là aussi un épisode de virémie. L'infection peut également se développer lors d'une transmission materno-fœtale (Gandhi et Khanna., 2004 ; Hudnall et al., 2011).

Chez le nouveau-né, le CMV est responsable de la maladie des inclusions cytomégaliqes. Ce sont des nouveau-nés qui naissent infectés, avec deux séries de symptômes graves. Des signes d'infection générale (hépatosplénomégalie, ictère, thrombopénie, pneumonie, chez un enfant de faible poids de naissance (<2500 g, retard de croissance), et des signes d'atteinte céphalique (microcéphalie, calcifications intracérébrales périventriculaires, chorioretinite). Il en résulte une mortalité élevée ou de lourdes séquelles psychomotrices et sensorielles (Pass, 2005 ; Hudnall et al., 2011).

Chez l'adulte immunocompétent, l'infection, généralement asymptomatique, peut rarement se manifester sous forme de fièvre et/ou d'asthénie prolongée, de syndrome mononucléosique, de leucopénie, sous forme d'hépatite aiguë (ni A, ni B, ni C), exceptionnellement sous forme de syndrome de Guillain-Barré, de pneumonie ou d'encéphalite.

Chez les sujets immunodéprimés, la primo-infection et réinfection endogène sont également capables de donner des infections graves : encéphalite, chorioretinite à l'origine de cécité, des ulcérations (bouche, œsophage, colon, anus, organes génitaux), glomérulopathie, pneumonie, pancytopénie par infection médullaire (Gandhi et Khanna, 2004 ; Hudnall et al., 2011).

II.1.3.5. Réplication et latence

Le cytomégalovirus persiste à l'état latent comme tous les autres herpès virus. L'ADN viral a été mis en évidence dans de nombreux types cellulaires (cellules endothéliales, épithéliales ou encore cellules musculaires lisses) ce qui constitue de nombreux sites potentiels de latence. Ainsi, de nombreux organes hébergent le virus à l'état latent et peuvent être impliqués dans la transmission du virus lors de transplantation. Cependant, à ce jour, la capacité d'héberger naturellement le virus latent n'a été démontrée que pour les monocytes du sang périphérique et les progéniteurs

CD34+ de la moelle osseuse (Sinclair et Sissons, 2006 ; O'Connor et Murphy, 2012). Ces derniers, dont la nature exacte n'est pas connue, constituent le réservoir du virus. Chez l'individu sain, un monocyte sur 10 000 est infecté de façon latente. Ce site de latence est responsable de la transmission du virus par transfusion de produits sanguins labiles non déleucocytés provenant de donneurs séropositifs pour le CMV (Fillet et al., 2000). Les mécanismes moléculaires d'établissement et de maintien de la latence, et ceux de la réactivation restent peu connus, l'expression des gènes viraux dans les monocytes étant limitée aux transcrits associés à l'état de latence (transcrits des gènes IE1) (Kondo et al., 1994 ; Sinclair et Sissons, 2006). Le virus se réactive périodiquement chez le sujet immunocompétent, ce qui conduit à des épisodes d'excrétion intermittente de virus dans les sécrétions respiratoires, l'urine, le sperme, les sécrétions cervicales, qui sont ainsi des sources potentielles de transmission du virus. Le système immunitaire joue donc un rôle complexe : il contrôle l'état de latence comme en témoigne la fréquence des réactivations chez les sujets immunodéprimés, mais l'activation immune favorise la réactivation (Sinclair et Sissons, 2006).

II.1.3.6. Diagnostic biologique

La plupart des infections à CMV sont asymptomatiques. Diverses techniques sont utilisées pour diagnostiquer l'infection à CMV :

- **La culture virale** : Les techniques de culture virale ne sont réalisables qu'au sein d'un laboratoire spécialisé en virologie. En effet, ces techniques délicates nécessitent d'une part, un équipement permettant de réaliser de la culture cellulaire et d'autre part, une prise en charge par un personnel expérimenté. La technique de culture rapide qui a remplacé la culture traditionnelle permet d'obtenir des résultats en 48 heures avec une meilleure sensibilité que la technique classique (Leruez-Ville et Rouzioux, 2001 ; Ross et al., 2011).

- **L'antigénémie pp65** : Cette technique permet de détecter et de quantifier la viremie à CMV (c'est-à-dire le nombre de cellules sanguines circulantes infectées par le CMV en phase répliquative). La détection de l'antigénémie pp65 est beaucoup plus sensible que la culture virale pour détecter une virémie à CMV et a largement supplanté cette dernière. Elle a aussi l'avantage d'être quantitative puisque l'on peut estimer le nombre de cellules positives pour 100 000 leucocytes déposés sur la lame (Grefte, 1992 ; Leruez-Ville et Rouzioux, 2001 ; Ross et al., 2011).

- **Les techniques de biologie moléculaire** : Les techniques de biologie moléculaire sont de plus en plus utilisées pour le diagnostic des infections à CMV. Elles présentent en effet l'avantage, par rapport aux techniques de culture cellulaire ou à l'antigénémie pp65, d'être réalisables de

manière différée sur des prélèvements stockés congelés, et d'être rapides, sensibles et automatisables. Ces techniques peuvent être réalisées sur de nombreux prélèvements (sang, leucocytes, urines, LCR, biopsies, liquide amniotique, sécrétions cervico-vaginales). Cependant, la PCR en temps réel se révèle plus sensible et plus spécifique que les autres techniques PCR (Tanaka, 2000 ; Caliendo et al., 2001 ; Leruez-Ville et Rouzioux, 2001 ; Ross et al., 2011).

- **La sérologie** : La recherche d'IgG et IgM anti-CMV est actuellement réalisée à l'aide de trousse ELISA commerciales qui utilisent des protéines recombinantes ou des peptides de synthèse. La recherche est réalisée par des tests ELISA avec immunocapture ; les IgM anti-CMV ne sont présentes que dans environ 70 % des primo-infections chez le sujet immunocompétent. La détermination de l'index d'avidité repose sur le fait que les IgG apparaissant lors d'une primo-infection ont une faible avidité pour l'antigène. On peut mesurer l'avidité des IgG pour un antigène en comparant le titre des anticorps en présence ou non d'urée, en effet l'urée détruit les anticorps peu spécifiques. En pratique, lors de la primo-infection à CMV, l'index d'avidité des IgG anti-CMV sera bas (< 30 %), alors que, dans une infection ancienne, il sera élevé (> 70 %) (Leruez-Ville et Rouzioux, 2001 ; Ross et al., 2011).

II.1.3.7. Traitement- Prévention

Le traitement antiviral spécifique dépend des manifestations cliniques. Il est réservé aux infections graves chez les sujets immunodéprimés et, exceptionnellement, chez les sujets immunocompétents.

Trois molécules sont disponibles pour le traitement des infections à CMV : un analogue nucléosidique, le ganciclovir (Cymevan®), un analogue nucléosidique monophosphaté, le cidofovir (Vistide ®), et un analogue de pyrophosphate inorganique, le foscarnet (Foscavon®) ou phosphonoformate. L'aciclovir et son promédicament, le valaciclovir (Zelitrex ®) sont utilisés uniquement en prophylaxie. Toutes ces molécules inhibent l'activité de l'ADN polymérase virale UL54 et sont donc sans action sur le virus latent (Hantz et al., 2009).

A ce jour, aucun traitement pendant la grossesse n'a été validé mais deux pistes thérapeutiques basées l'une sur l'utilisation d'antiviraux, l'autre sur l'administration d'immunoglobulines spécifiques sont en cours d'étude (Hantz et al., 2009). La vaccination qui fait l'objet de nombreux travaux reste un espoir pour prévenir la transmission materno-fœtale (Gandhi et Khanna., 2004 ; Hantz et al., 2009).

II.2. les ulcérations génitales (UG)

Les infections sexuellement transmissibles (IST) sont un problème majeur de santé publique dans les pays en développement et plus particulièrement en Afrique de par leurs morbi-mortalité et leurs répercussions sur la santé sexuelle et génésique (OMS, 2007). L'avènement de la pandémie de l'infection à VIH, a donné un regain d'intérêt pour ces infections sexuellement transmissibles (IST) du fait des différentes interactions qui existent entre ces maladies (Ward et Ronn, 2010). Les IST entraînant des ulcérations génitales ont été les plus associées à l'acquisition et à la transmission du VIH comparativement aux autres IST car elles augmentent non seulement l'excrétion génitale du VIH mais aussi la sensibilité des personnes séronégatives pour acquérir le virus (O'Farrell, 2001 ; OMS, 2007 ; Kalichman et al., 2011).

Anatomiquement, un ulcère est une rupture de la continuité de la peau et/ou de la membrane muqueuse, impliquant la perte tissulaire de l'épiderme, du derme ou de l'hypoderme (Saurat et al., 2009).

L'OMS, regroupe sous l'appellation ulcération génitale (UG) toutes lésions vésiculeuses, ulcéreuses, érosives ou pustuleuses, accompagnées ou non d'une adénopathie régionale et siégeant sur le pénis, le scrotum ou le rectum chez l'homme et sur les lèvres vaginales, le vagin, le col de l'utérus ou le rectum chez la femme (OMS, 2007).

Les ulcères génitaux sont un des principaux signes de diverses maladies qui ont affligé l'humanité depuis l'Antiquité, dont le diagnostic étiologique demeure difficile (Engelkens et Stoltz, 1993 ; Bruisten, 2003). Ces ulcères peuvent varier selon le siège, l'étiologie, la durée d'évolution clinique, l'âge et l'immunité de l'hôte, menant à la confusion diagnostique et des résultats thérapeutiques insatisfaisants (Pinotti et al., 1998).

Dans un but didactique, Les ulcères génitaux peuvent être divisés en des ulcères causés par des infections sexuellement transmissibles et ceux causés par des maladies non-sexuellement transmises (Engelkens et Stoltz, 1993).

Le syndrome ulcéreux génital peut être causé par diverses IST notamment : *Treponema pallidum* (syphilis), *Haemophilus ducreyi* (chancre mou), *Chlamydia trachomatis* sérovars L1-L3 (Lymphogranulome vénérien), *Klebsiella granulomatis* (granulome inguinal ou donovanose) et *Herpès simplex virus* type 1 et 2 (herpès génital) (Behets et al., 1999 ; Risbud et al., 1999 ; Phiri et al., 2013). Parmi ces infections HSV-2 est de loin la première cause d'UG dans le monde en développement (O'Farrell, 1999). En Afrique subsaharienne HSV-2 est la principale cause d'UG avec une séroprévalence variant de 30% à 80% chez les femmes et de 10% à 50% chez les hommes (Paz-Bailey et al., 2005 ; OMS, 2007).

Les ulcères non infectieux résultent principalement de traumatisme, de réactions allergiques aux médicaments, du pemphigus, de la maladie de Behçet, le syndrome de Reiter (ulcère, arthrite et uvéite), ulcère de Lishtpuetz (Ulcus) (Engelkens et Stoltz, 1993 ; Kathleen, 2012).

Il est très difficile d'établir rapidement un diagnostic étiologique clair et définitif d'une ulcération génitale. Des études qui décrivent entièrement la fréquence des différentes causes d'ulcérations génitales dans chaque région sont recommandées, aussi bien que leurs principales présentations cliniques, les différentes caractéristiques microbiologiques et histologiques pour une prise en charge efficace de ces affections (OMS, 2007).

II.3. Les ulcérations génitales et immunodépression

Comparativement au sujet immunocompétent, les manifestations cliniques herpétiques observées chez l'immunodéprimé sont plus fréquentes, volontiers chroniques, souvent atypiques et posent par conséquent des problèmes diagnostiques et thérapeutiques. Ces formes particulières d'herpès surviennent en cas de déficit exclusif ou prédominant de l'immunité cellulaire, que celui-ci soit primitif (syndrome de Wiskott-Aldrich, ataxie-télangiectasie) ou acquis (hémopathies, chimiothérapies, immunosuppresseurs, greffe de moelle, transplantation d'organes, infection à VIH) (Descamps et al.,1997 ; Laurent, 2002).

Il s'agit habituellement d'une réactivation d'un herpès latent qui revêt un tableau atypique, sévère ou chronique, en raison de l'atteinte de l'immunité cellulaire. Leur expression clinique est variable suivant le stade d'immunodépression. Des lésions classiques, buccales ou génitales, sont observées chez les patients ayant une immunodépression minimale à modérée. Elles ne diffèrent pas des lésions observées chez l'immunocompétent. Au stade avancé de la maladie, les manifestations cliniques sont beaucoup plus inhabituelles, caractérisées par leur extension, leur caractère floride, volontiers ulcéronécrotique et leur durée d'évolution, fréquemment chronique. La chronicité des lésions rend compte d'aspects particuliers pseudotumoraux de certaines lésions ulcérées (Descamps et al.,1997 ; Laurent, 2002).

Les localisations les plus fréquentes sont périanales, génitales et orofaciales. Il s'agit souvent de vastes ulcérations douloureuses, d'extension progressive, sans tendance à la cicatrisation spontanée. Leur caractère nécrotique, creusant, est souvent noté. Les surinfections bactériennes et fongiques sont plus fréquentes que chez l'immunocompétent. Une dissémination hémotégène peut être à l'origine d'atteintes viscérales variées. Les lésions anogénitales peuvent atteindre toute la région périnéale, entraînant des douleurs et une incontinence sphinctérienne (Descamps et al., 1997 ; Laurent, 2002).

III- MATERIEL ET METHODES

III.1. Type et période d'étude

Il s'est agi d'une étude de cohorte rétrospective qui a porté sur les données biologiques et cliniques collectées et les échantillons obtenus à partir de lavages cervico-vaginal enrichis (LCVe) dans le cadre de l'essai randomisé contrôlé en double aveugle ANRS 1285. Les données et les échantillons ont été collectés entre août 2004 et juin 2005.

III.2. Cadre de l'étude

Cette étude s'est déroulée au Burkina Faso dans la ville de Bobo-Dioulasso, à la clinique du projet Yerelon et au Laboratoire Mixte de Biologie Moléculaire du Centre MURAZ.

La clinique du projet Yerelon est située dans l'enceinte du Service d'Hygiène de Bobo-Dioulasso. Elle est contiguë au Centre Hospitalier Universitaire Souro Sanou (CHUSS) qui est le Centre de référence sanitaire pour toute la moitié Ouest du Burkina Faso. C'est au sein de cette clinique que les données cliniques et les échantillons biologiques ont été collectés lors des visites de suivi des participantes.

Le laboratoire Mixte de Biologie Moléculaire du Centre MURAZ est une plateforme pour le diagnostic moléculaire des infections virales (VIH, Hépatites, Herpès virus), bactériennes (méningites bactériennes, les mycobactéries) et parasitaires (plasmodium, leishmanioses...). Cette plateforme participe à la formation des étudiants et aussi à des programmes d'assurance qualité nationaux et internationaux comme celui organisé par l'ANRS. A moindre mesure, cette plateforme contribue également à la réalisation des tests pour des patients externes et dans le cadre de partenariats établis avec des structures et associations tant au niveau national que sous-régional.

De même, dans le cadre du master, nous avons bénéficié d'un séjour de 3 mois à l'unité de biologie moléculaire du service de Bactériologie Virologie de l'Hôpital Aristide Le DANTEC, Dakar au SENEGAL pour un stage de perfectionnement en vue d'améliorer nos compétences en biologie moléculaire.

III.3. Population de l'étude

Notre population d'étude était constituée des femmes de la cohorte Yerelon II. Il s'agit de femmes multipartenaires (travailleuse du sexe (tabouret, trotteuses), serveuses de bars, vendeuses dans les cabarets, vendeuses (ambulantes et fixes), élèves et étudiantes, employées du petit commerce) [Nagot et al., 2002] et de femmes provenant d'associations de personnes vivant avec le VIH recrutées dans la ville de Bobo-Dioulasso dans le cadre des essais ANRS 1285 (Ouedraogo et al., 2006 ; Nagot et al., 2007).

III.4. Echantillonnage et critères d'inclusions

Pour cette analyse, nous avons procédé à un échantillonnage exhaustif de toutes les participantes de la cohorte Yerelon II (Nagot et al., 2007) répondant aux critères ci-dessous :

- Agées d'au moins 18 ans ;
- Coinfectées par le VIH-1 et HSV-2 ;
- sans besoin d'ARV ou sous traitement ARV depuis plus de 3 mois ;
- Ayant signé un formulaire de consentement éclairé ;
- Ayant participé à l'étude ANRS 1285 ;
- Disposer d'échantillons de LCVe d'avant et après randomisation pour la recherche de l'ADN du CMV, du EBV et de HSV-2.

III.5. Collecte des données

Les données sociodémographiques, biologiques et cliniques ont été collectées lors des visites de suivi. A chaque visite, les participantes étaient soumises à un questionnaire, un examen clinique et des prélèvements gynécologiques étaient effectués.

Le design des essais ANRS 1285 incluait 6 visites d'observation avant randomisation puis 6 visites après mise sous traitement (valaciclovir ou placebo 500mg x 2/j pendant 3mois). Un délai de 2 semaines était maintenu entre 2 visites. A chaque visite, un prélèvement par lavage cervico-vaginal enrichi d'un écouvillon cervical (LCVe) était pratiqué, et du plasma était collecté une visite sur deux pour la quantification de la charge virale plasmatique du VIH-1 plasmatique. Les aliquotes de LCVe ont été stockés à -80°C à chaque visite soit 12 prélèvements par participante.

III.6. Technique de recueil des échantillons de LCVe

Le liquide de lavage cervico vaginal a été utilisé pour la détection/quantification des virus HSV-2, CMV et EBV. Le lavage cervico vaginal a été effectué à l'aide de 2ml de solution physiologique salée pendant 60 secondes et recueilli dans un tube. Un écouvillon de polyester a été appliqué au col de l'utérus et une rotation de 360° a été réalisée de sorte à éviter tout traumatisme de la muqueuse. Le liquide recueilli sur les parois du col utérin a été mélangé au LCV donnant ainsi un LCV « enrichi » (LCVe) qui a été réparti dans 4 cryotubes à raison de 0,5ml par cryotube puis congelé à - 80°C. Le LCVe était collecté chaque deux semaines durant 24 semaines soit 12 prélèvements par participante.

III.7. Analyses de laboratoire

III.7.1. Sérologie VIH

Les sérologies VIH ont été déterminées en utilisant le test rapide Détermine HIV-1 / 2 (Abbott Laboratories, Tokyo, Japon) en première intention puis pour la confirmation/discrimination les sérums positifs avec le test rapide Genie-II (Bio-Rad Laboratories, Redmond, WA, USA).

III.7.2. Techniques de détection de l'ADN des herpès virus

La technique de PCR en temps réel a été utilisée pour la détection/quantification de l'ADN du HSV-2, du CMV et du EBV. Pour cela nous avons réalisé une extraction suivie d'une amplification. Cette technique de PCR en temps réel a été mise au point et validée en collaboration avec le laboratoire de Virologie du CHU de Montpellier en France (technique-maison) et un transfert de technologie a été effectué vers le centre MURAZ.

Pour des raisons pragmatiques, nous n'avons testé que trois des six visites dans chaque phase du projet (soit 6 visites au total par femme). Il a précédemment été estimé que trois visites étaient suffisantes pour prendre en compte la variabilité de l'excrétion virale génitale (Nagot et al., 2005). Les visites n°1, n°3 et n°6 ont ainsi été sélectionnées pour chaque phase. Si un échantillon est manquant, il était remplacé par l'échantillon de la visite suivante.

III.7.2.1. Extraction de l'acide désoxyribonucléique (ADN) à partir du LCVe

L'ADN a été extrait du LCVe en utilisant le Kit d'extraction QIAmp DNA Mini Kit Handbook (QIAGEN), conformément aux instructions du fabricant (annexe 1).

III.7.2.2. Amplification : Protocole TaqMan Générique

L'ADN extrait a été amplifié en utilisant l'ABI 7000, technologie TaqMan (annexe 2). Pour les 3 virus le protocole était le même (TaqMan Générique) mais les amorces, les sondes et les contrôles de quantification (gammas) étaient spécifiques de chaque virus.

- Protocole CMV (annexe 3)
- Protocole HSV-2 (annexe 4)
- Protocole EBV (annexe 5)

Les seuils de détection étaient de 180 copies/ml pour le CMV, de 190 copies/ml pour le EBV et de 300 copies/ml (2,47 log₁₀) copies/ml pour HSV-2.

III.7.2.3. La *Real-time* PCR ou PCR en temps réel par sonde TaqMan

➤ Définition

Elle est basée sur la détection et la quantification d'un reporter fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR. Les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle (Poitras et Houde, 2002 ; Ameziane et al., 2006).

➤ Technologie TaqMan

La technologie Taqman est basée sur l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase pour hydrolyser une sonde hybridée à sa séquence cible sur l'amplicon durant l'étape d'extension de la PCR. Un fluorophore émetteur « reporter » est fixé à l'extrémité 5' de la sonde d'hybridation et son émission est inhibée par un second fluorophore suppresseur « quencher » présent à l'extrémité 3' (Poitras et Houde, 2002 ; Ameziane et al., 2006). On utilise pour la réaction :

- 2 amorces : une amorce sens qui se fixe sur le brin négatif et une amorce anti-sens qui se fixe sur le brin positif. Elles délimitent la région d'intérêt (ADN) à amplifier et servent d'amorce pour l'ADN polymérase ;
- des sondes oligonucléotides complémentaires d'une séquence interne du fragment d'ADN à amplifier. Chaque oligonucléotide a à son extrémité 5' un fluorophore émetteur (reporter) et à l'extrémité 3' un fluorophore suppresseur ou « quencher ». Lorsque le reporter et le quencher sont proches (1-5 nucléotides), la fluorescence est absorbée par le quencher ;
- un tampon réactionnel qui contient du Mg^{2+} et du K^+ ou du NH_4^+ , une enzyme (Taq-polymérase), les dNTPs.

L'amplification comporte trois étapes :

- 1) la dénaturation de l'ADN par ouverture pour obtenir des matrices simple brin ;
- 2) l'hybridation : la délimitation et le début de la réplication de la séquence à amplifier à l'aide d'oligonucléotides amorces spécifiques ;
- 3) la réalisation de la réaction de polymérisation du brin complémentaire.

La figure ci-dessous illustre le principe de la PCR en temps réel.

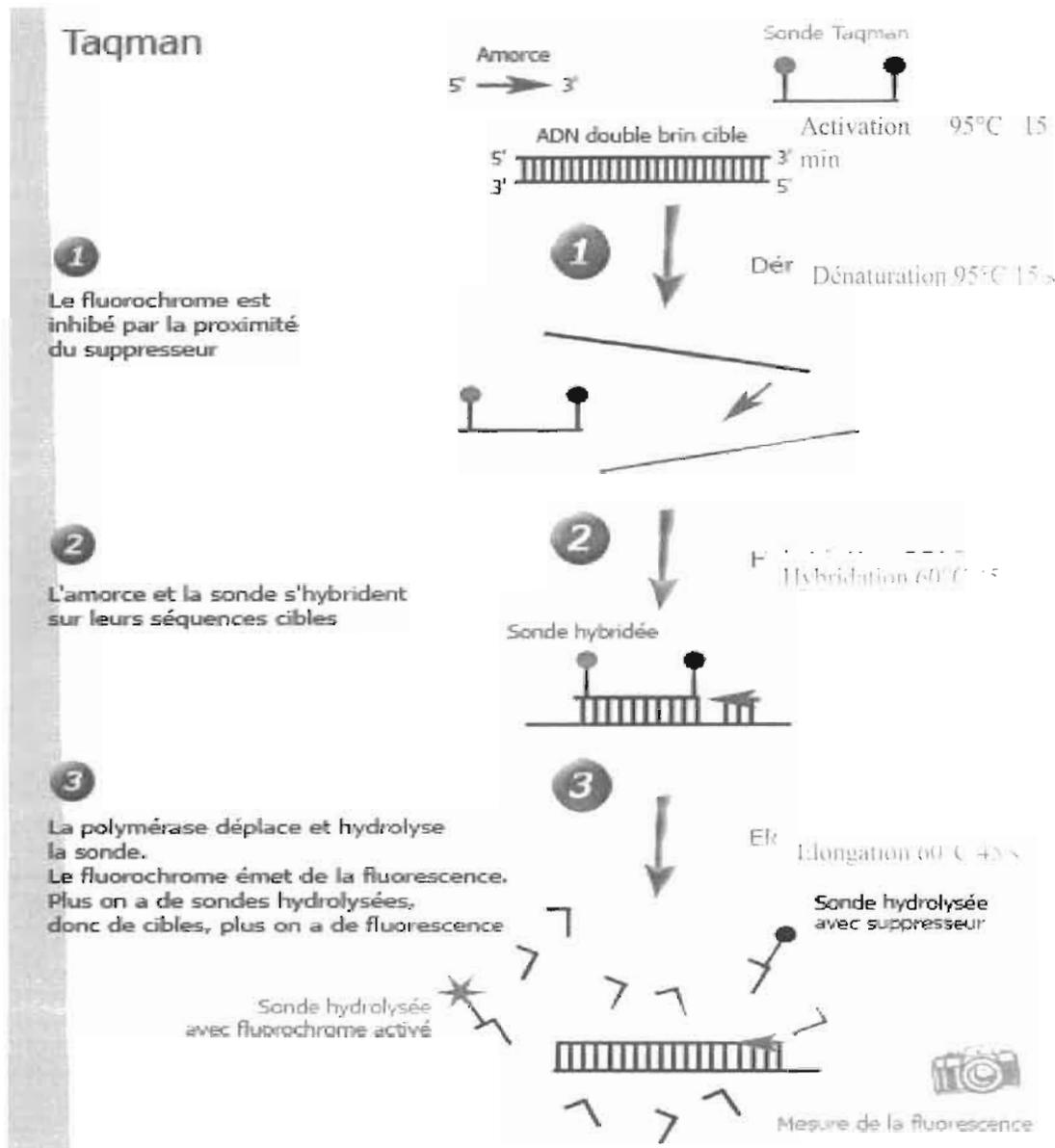


Figure 4: Principe de la PCR en temps réel (Poitras et Houde, 2002 ; Ameziane et al., 2006).

III.8. Les variables de l'étude

- L'âge des participantes,
- Le statut matrimonial,
- Niveau scolaire,
- L'occupation professionnelle,
- La prise ou non de traitement ARV,
- La présence ou non d'une ulcération génitale,
- Le siège des lésions d'ulcérations,
- Détection du HSV-2, du CMV et du EBV dans le LCVe,
- La phase de l'étude,
- La prise du valaciclovir ou du placebo.

III.9. Analyses statistiques

Le plan d'analyse prévoyait d'une part une description des caractéristiques sociodémographiques, cliniques et biologiques à l'inclusion dans l'étude; et d'autre part l'utilisation d'un modèle de régression logistique pour retenir les caractéristiques (sociodémographiques, biologiques et cliniques) associées à la survenue d'une ulcération génitale lors des phases de l'étude.

Dans un modèle de Cox univarié, l'association de chacune des caractéristiques décrite ci-dessus a été recherchée avec la variable d'intérêt. Les variables associées à la variable d'intérêt au seuil de 30 % ont été introduites dans le modèle de Cox multivarié. Nous avons utilisé une démarche descendante pour la réduction des variables contenues dans le modèle en retranchant à chaque étape la variable ayant la p value la plus élevée au-dessus de 5%.

Le test de Chi carré a été utilisé pour la comparaison des proportions avec un seuil de significativité $p < 0,05$.

Le logiciel Epi Info 7 a été utilisé pour l'analyse statistique des données.

III.10. Considérations éthiques

L'étude ANRS 1285 a été approuvée par le Comité d'éthique institutionnel du Centre MURAZ, Bobo-Dioulasso et le Comité d'éthique national du Burkina Faso (actuel Comité d'éthique pour la recherche en santé). Toutes les participantes ont signé un consentement éclairé avant d'être incluses dans l'étude.

III.11. Définitions Opérationnelles

- **Ulcération génitale** : Dans cette étude nous avons considéré comme ulcération génitale toute lésion vésiculeuse ou perte de substance siégeant sur le col utérin, dans le vagin, sur les lèvres vaginales ou sur la région périnéale constatée au cours de l'examen gynécologique.
- **Phase d'observation**: période de suivi avant randomisation.
- **Phase traitement** : Période après randomisation et mise sous valaciclovir ou placebo.
- **Excrétion d'un virus durant la phase d'observation**: détection du virus en question dans au moins un échantillon de LCVe de la phase.
- **Excrétion d'un virus durant la phase traitement** : détection du virus en question dans au moins un échantillon de LCVe de la phase traitement.

III.12. Les limites de l'étude

➤ L'absence de la sérologie du CMV et du EBV dans cette étude ne nous a pas permis d'avoir la proportion exacte des participantes infectées par ces deux virus. La non détection des virus dans le LCVe n'est pas synonyme de non infections par ces virus :

➤ Nous n'avons pas recherché le CMV, le EBV et le HSV-2 dans les lésions ulcéraives par écouvillonnage des lésions. La présence des virus dans les lésions d'ulcération pourrait conforter leur étiologie herpétique ;

➤ La technique de collecte du LCVe n'était pas homogène . Le lavage cervico-vaginal était effectué par différents médecins. Nous pensons qu'il pourrait avoir une variabilité inter individu dans la technique de collecte de l'échantillon.

IV- RESULTATS

IV.1. Caractéristiques des participantes

Au total 194 participantes coinfectedées par le VIH-1 et HSV-2 ont été incluses dans notre étude. Le suivi des participantes a duré 24 semaines soit 12 semaines de phase d'observation et 12 semaines de phase traitement.

L'âge médian des participantes était de 32 ans et environs 10 % étaient des professionnelles du sexe. Les participantes aux stades OMS 3 et 4 de l'infection à VIH représentaient 38% de l'effectif. A l'inclusion dans l'étude, 30,4 % des participantes étaient sous traitement antirétroviraux. Après randomisation, 50% ont été mise sous valaciclovir et l'autre moitié sous placebo.

Le tableau I présente les caractéristiques des participantes à l'étude.

Tableau I: Caractéristiques sociodémographique, cliniques, thérapeutiques et biologiques des participantes à l'inclusion.

Paramètres	N (%) ou médiane [IQR]
Caractéristiques sociodémographiques	
Age Median à l'inclusion (IQR) – ans	32 [27-39]
Profession - n. (%)	
<i>Professionnelles du sexe</i>	19 (9,8)
<i>Serveuses de bar</i>	36 (18,6)
<i>Vendeuses*</i>	43 (22,2)
<i>Autres Professions**</i>	96 (49,4)
Niveau d'instruction - n. (%)	
<i>Aucun</i>	83 (42,8)
<i>1-6 ans (Primaire)</i>	57 (29,4)
<i>≥ 7 ans (Secondaire ou supérieur)</i>	54 (27,8)
Statut Matrimonial - n. (%)	
<i>Célibataire/Divorcée/Séparée/Veuve</i>	149 (76,8)
<i>Mariée/Vie de couple</i>	45 (23,2)
Caractéristiques cliniques et thérapeutiques	
Stade OMS - n. (%)	
<i>Stade 1</i>	76 (39,2)
<i>Stade 2</i>	45 (23,2)
<i>Stade 3 et 4</i>	73 (37,6)
Traitement ARV en cours n. (%)	59 (30,4)
Traitement anti herpétique- n. (%)	
<i>Valaciclovir</i>	97 (50)
<i>Placebo</i>	97 (50)
Caractéristiques biologiques (CD4)	
Nombre de CD4 cellules/μL [IQR]	389 [255-558]
<i><200</i>	23 (11,9)
<i>200-500</i>	108 (55,7)
<i>>500</i>	63 (32,5)

* vendeuses ambulantes et fixes.

**Autres professions (doloitière, élève/étudiante autre secteurs informels).

IV.2. Les ulcérations génitales

IV.2.1. Fréquences

Chez les 194 femmes incluses, 88 épisodes d'ulcérations génitales ont été notés chez 63 personnes. Ces lésions étaient survenues dans 65,9 % des cas durant la phase d'observation et dans 34,1% pendant la phase de traitement antihéropétique. La figure 5 ci-dessous illustre la répartition des participantes selon le nombre d'épisodes constatés.

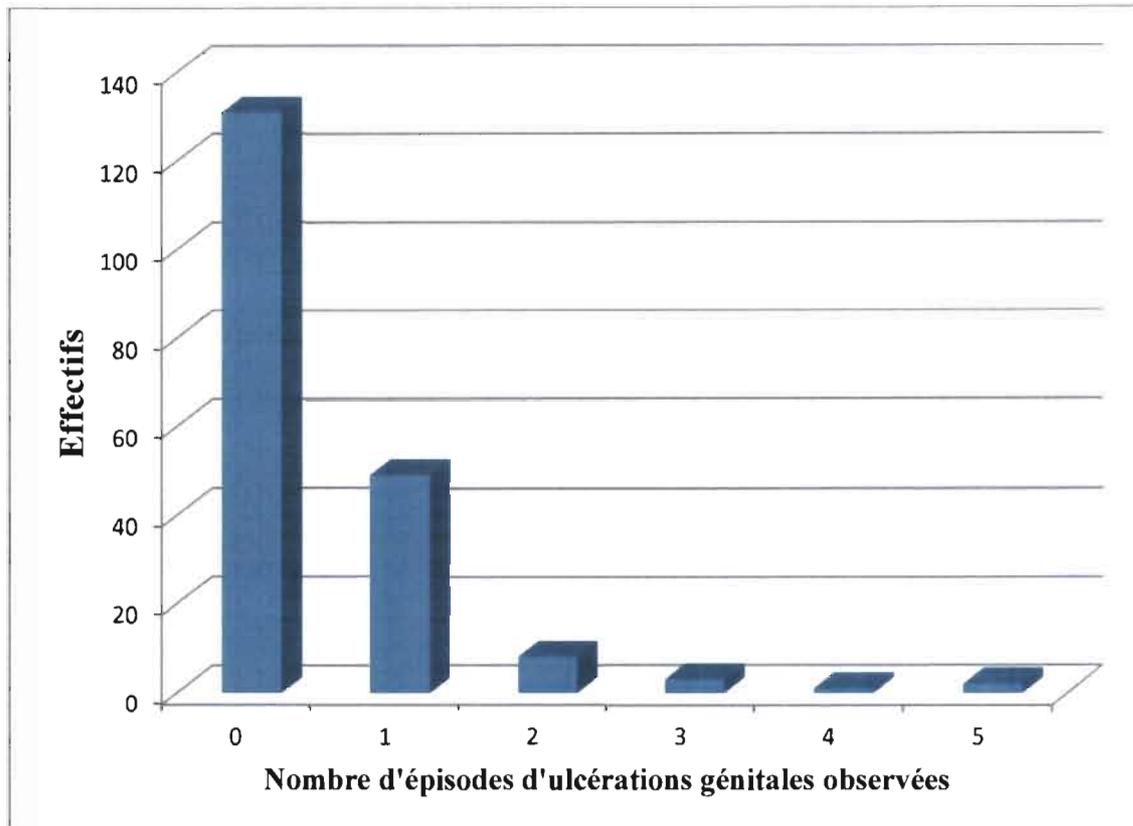


Figure 5: répartition des participantes selon le nombre total d'épisodes d'ulcérations génitales observés au cours du suivi.

Chez les femmes ayant présenté au moins un épisode, le nombre d'épisode d'ulcérations génitales variait de 1 à 5 et 22, 22 % ont présenté au moins 2 épisodes.

IV.2.2. Sièges des lésions

Les lésions d'ulcérations siégeaient sur les lèvres vaginales dans 60 % des cas, dans 3 % au niveau du vagin et dans 1 % des cas sur le col utérin. La figure 6 suivante montre la répartition des lésions selon le siège.

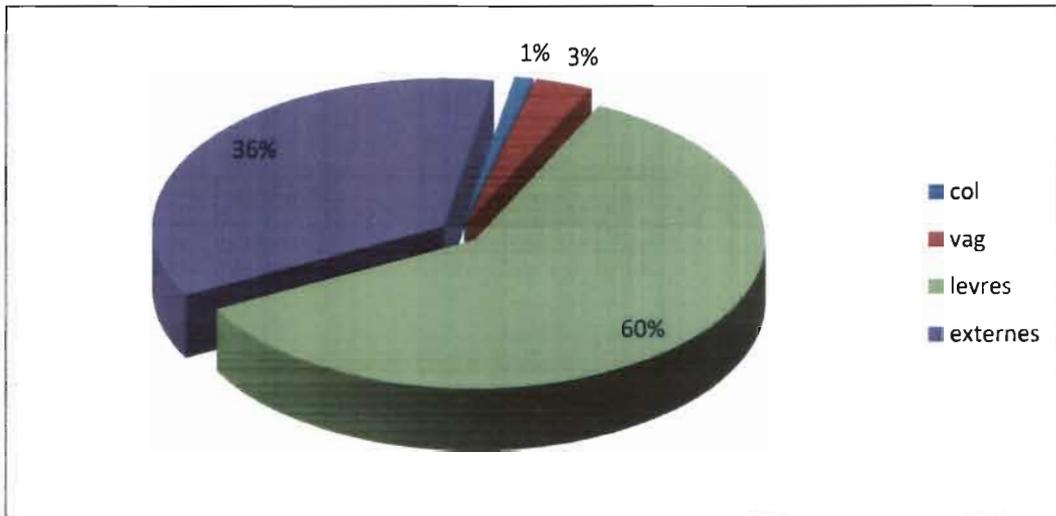


Figure 6: répartition des épisodes d'ulcérations génitales survenues au cours du suivi, selon le siège de la lésion.

IV.3. Excrétion génitale du CMV, du EBV et du HSV-2

IV.3.1. Répartition des participantes suivant le nombre et le type de virus détectés.

En prenant en compte les deux phases de l'étude, aucun des trois virus n'était détecté conformément aux seuils respectifs chez 7,7 % des participantes. Par contre, 22,7 % étaient détectable aux trois virus. Le EBV seul était détecté chez 19,6 %, le CMV seul chez 2,6% et le HSV-2 seul chez 6,7%. On notait 63% de coinfection herpétique La figure 7 ci-dessous illustre la répartition des patientes suivant le nombre et le type de virus détectés dans le LCVe.

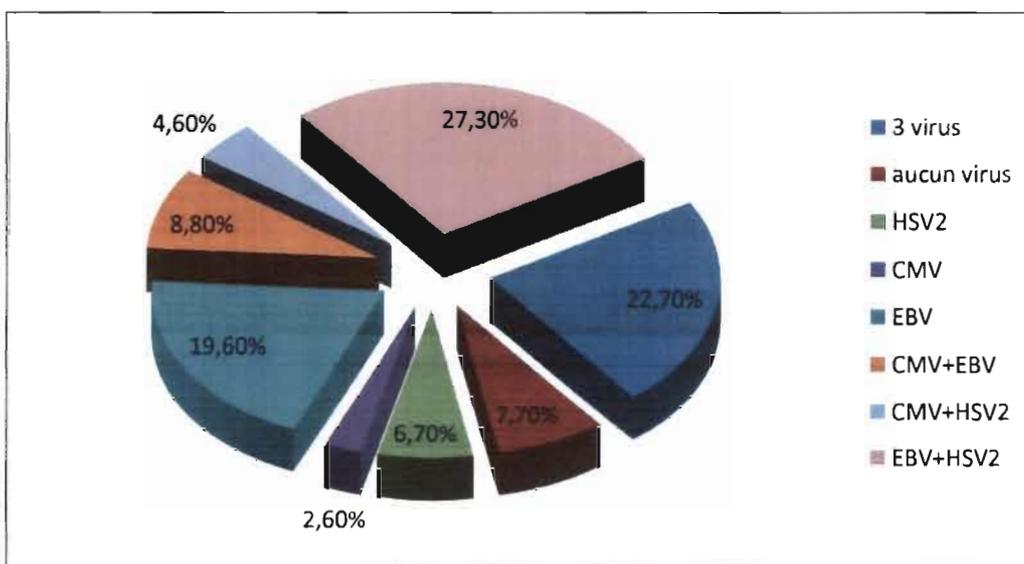


Figure 7: Répartition des participantes suivant le nombre et le type de virus détectés

IV.3.2. Répartition des différents virus détectés suivant la phase de l'étude.

Les trois virus étaient détectés durant les deux phases de l'étude. Les proportions de détection des virus lors de la phase d'observation et de traitement étaient respectivement de 22,7% et 29,4% pour le CMV, de 66,5% et 60,8% pour le EBV et de 45,9% et 36,4 % pour le HSV-2. En comparant les deux phases l'on notait une différence significative entre les taux de détection du CMV ($X^2= 24,21$; $p= 0,000$), du EBV ($X^2= 26,55$; $p= 0,000$) et du HSV-2 ($X^2= 6,3547$; $p= 0,012$).

La figure 8 ci-dessous présente la répartition des virus détectés durant les deux phases de l'étude.

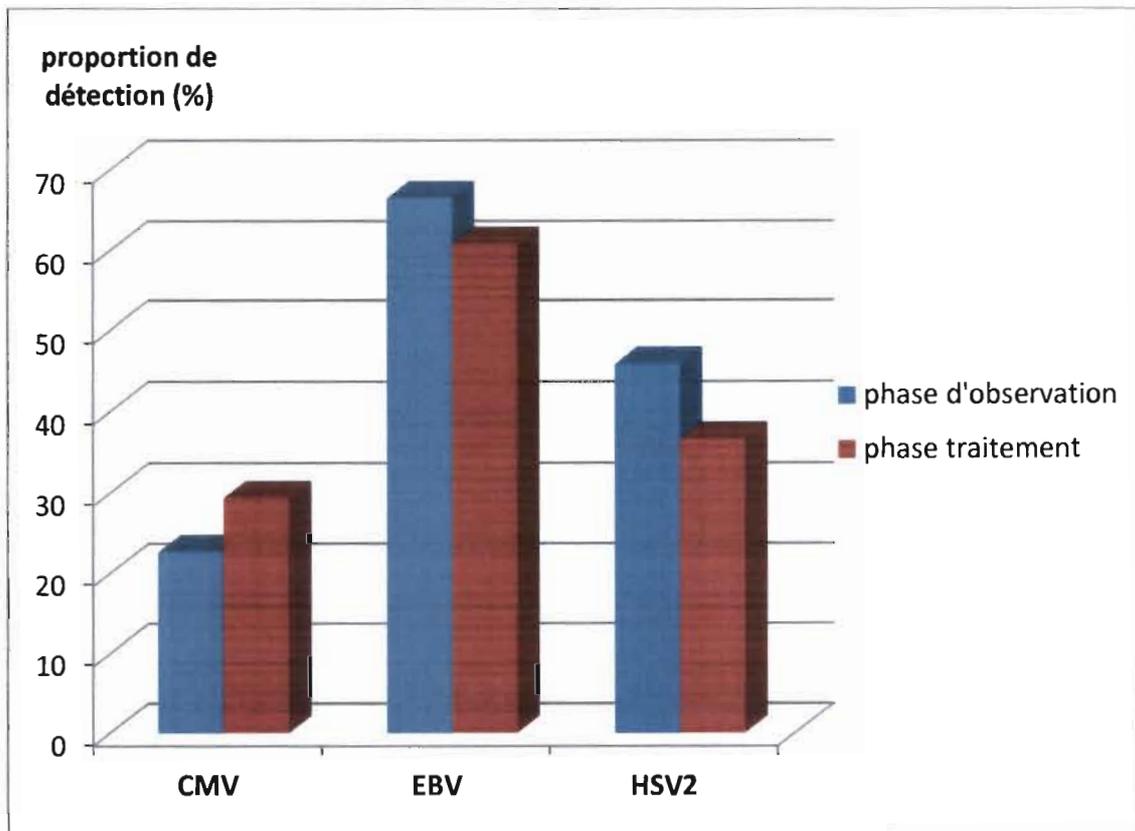


Figure 8: Répartition des virus détectés dans le LCVe suivant la phase de l'étude.

IV.3.3. Répartition des différents virus détectés suivant la prise du valaciclovir ou du placebo.

Les proportions de détection des virus chez les participantes sous valaciclovir ou placebo étaient respectivement de 26,8% et 32% pour le CMV, de 51,5% et 70,1% pour le EBV et de 22,7 % et 50,2 % pour le HSV-2.

Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les taux de détection du CMV suivant la prise ou non du valaciclovir ($X^2= 0,62$; $p= 0,43$). La différence était statistiquement

significative entre les taux de détection du EBV ($X^2= 7,01$; $p= 0,01$) et du HSV-2 ($X^2= 16,19$; $p= 0,000$) suivant la prise ou non du valaciclovir.

La figure 9 ci-dessous présente la répartition des virus détectés suivant la prise ou non du valaciclovir.

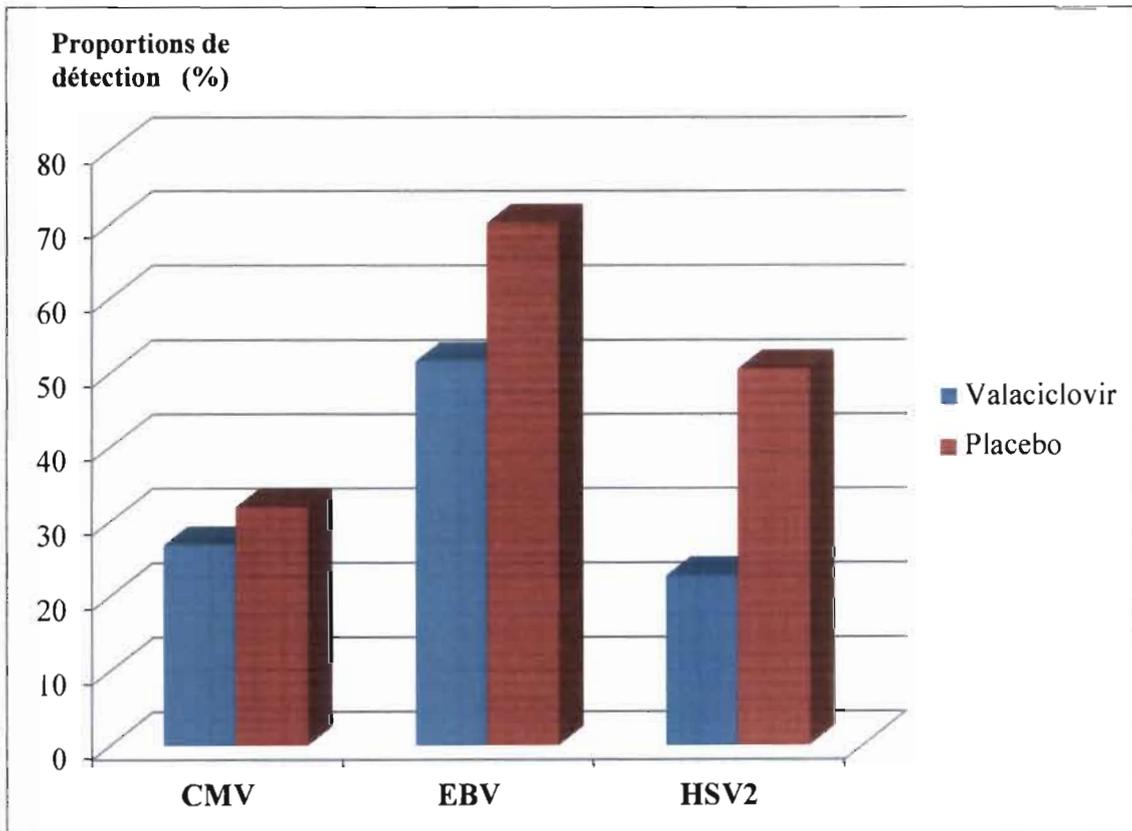


Figure 9: Répartition des virus détectés dans le LCVe suivant la prise ou non du Valaciclovir.

IV.4. Détection des herpès virus et présence d'une ulcération génitale

IV.4.1. Détection des herpès virus et présence d'une ulcération génitale à la phase d'observation.

A la phase d'observation, les taux de détection des virus en présence et en l'absence d'une ulcération génitale étaient respectivement de 24,5% et 22,1 % pour le CMV, de 77,5 % et 62,8 % pour le EBV et de 53,1 % et 43,4% pour le HSV-2.

Il n'y'avait pas de différence statistiquement significative entre les taux de détection des virus suivant la présence ou l'absence d'une ulcération génitale (CMV : $X^2= 0,12$; $p= 0,73$; EBV : $X^2= 3,60$; $p= 0,058$; HSV-2 : $X^2= 1,36$; $p= 0,243$).

La figure 10 ci-dessous présente les proportions de détection des herpès virus suivant la présence ou l'absence d'une ulcération génitale en phase d'observation.

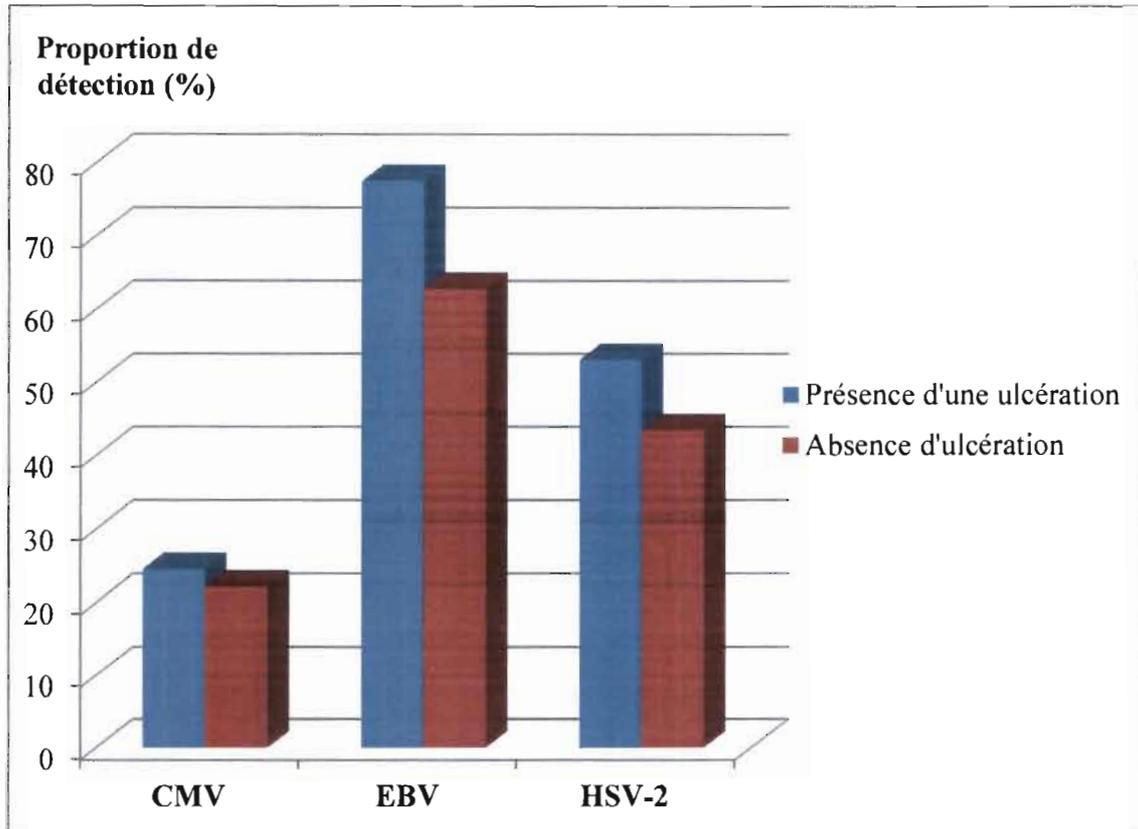


Figure 10: Proportions de détection des herpès virus suivant la présence ou l'absence d'une ulcération génitale durant la phase d'observation.

IV.4.2. Détection des herpès virus et présence d'une ulcération génitale à la phase de traitement antiherpétique.

Les taux de détection des virus en présence et en l'absence d'une ulcération génitale à la phase de traitement étaient respectivement de 32,0 % et 28,9 % pour le CMV, de 84,0 % et 57,4 % pour le EBV et de 72,0 % et 31,4 % pour le HSV-2.

Il n'y'avait pas de différence statistiquement significative entre les taux de détection du CMV ($X^2= 0,09$; $p= 0,76$) suivant la présence ou l'absence d'une ulcération génitale.

Les taux de détection du EBV ($X^2= 6,47$; $p= 0,01$) et du HSV-2 ($X^2=15,50$; $p= 0,00$) différaient significativement suivant la présence ou l'absence d'une ulcération génitale.

La figure 11 ci-dessous présente les proportions de détection des herpès virus suivant la présence ou l'absence d'une ulcération génitale en phase de traitement antiherpétique.

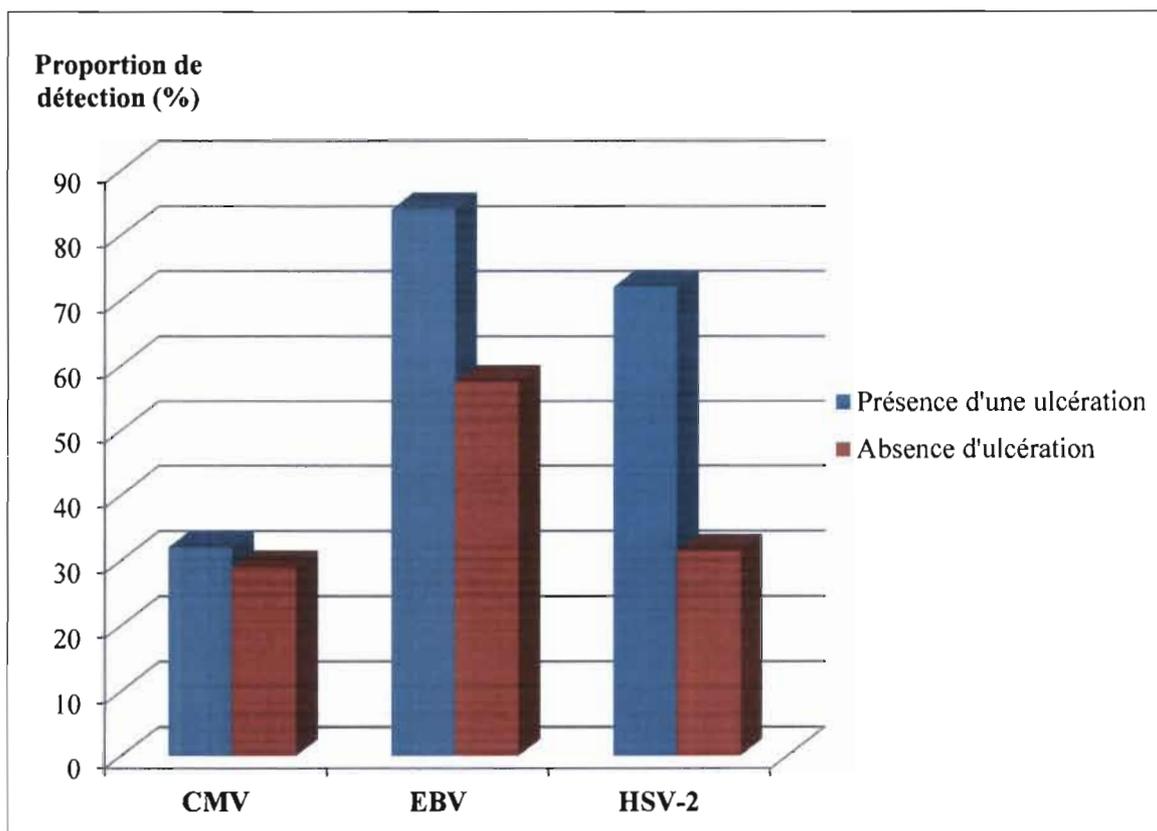


Figure 11: Proportions de détection des herpès virus suivant la présence ou l'absence d'une ulcération génitale à la phase de traitement antiherpétique.

IV.5. Impact du traitement antirétroviral sur l'excrétion des herpès virus.

IV.5.1. Impact du traitement ARV sur l'excrétion génital du CMV, du EBV et du HSV-2 durant la phase d'observation.

Durant la phase d'observation, les taux de détection des virus chez les participantes sous ARV et sans ARV étaient respectivement de 35,6 % et 17,0 % pour le CMV, de 61,0 % et 68,9 % pour le EBV et de 47,5 % et 45,2 % pour le HSV-2.

A la phase d'observation, la différence entre le taux de détection du CMV était statistiquement significative ($X^2= 8,06$; $p= 0,004$) suivant la prise ou non d'un traitement antirétroviral. Pour le EBV ($X^2= 1,14$; $p= 0,285$) et le HSV-2 ($X^2= 0,08$; $p= 0,770$) cette différence n'était pas significative.

La figure 12 ci-dessous présente l'excrétion du CMV, du HSV-2 et du EBV suivant la prise ou non d'un traitement antirétroviral en phase d'observation.

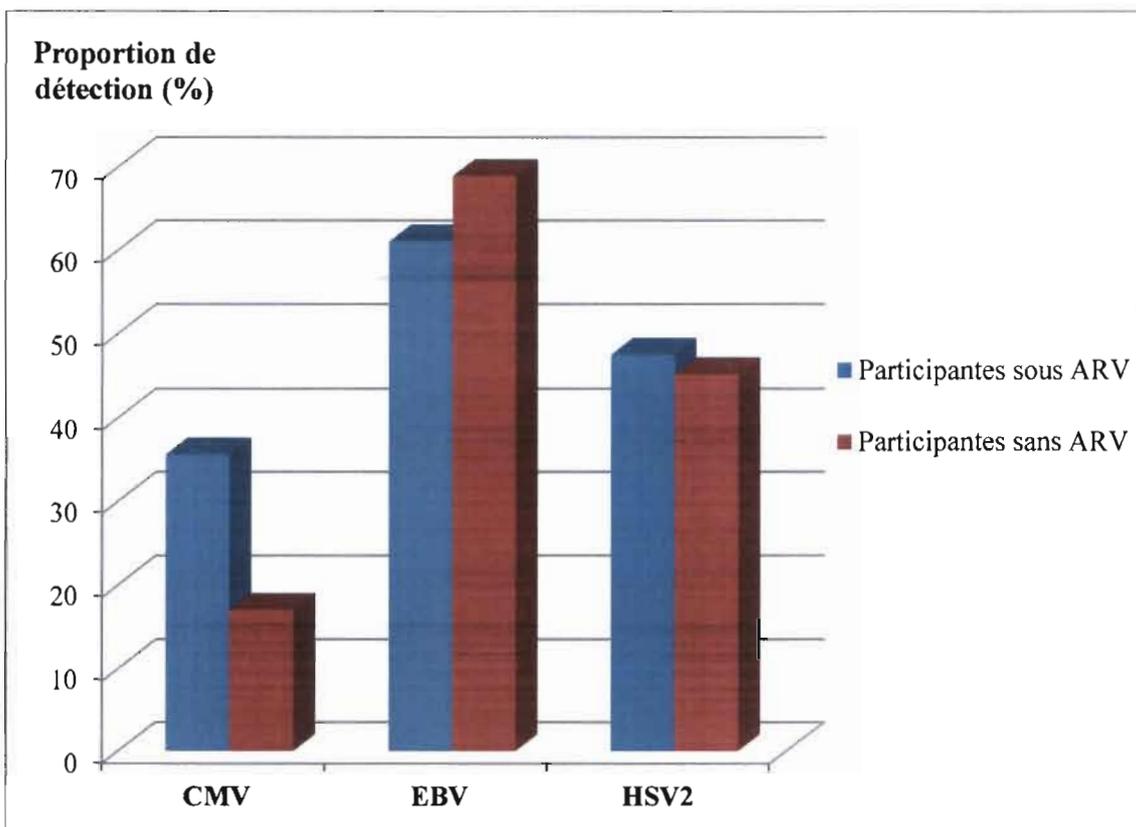


Figure 12: Excrétion du CMV, du EBV et du HSV-2 suivant la prise ou non d'un traitement antirétroviral en phase d'observation.

IV.5.2. Impact du traitement ARV sur l'excrétion génital du CMV, du EBV et du HSV-2 durant la phase de traitement antiherpétique.

A la phase de traitement antiherpétique, les taux de détection des virus chez les participants sous ARV et sans ARV étaient respectivement de 42,4 % et 23,7 % pour le CMV, de 47,5 % et 66,7 % pour le EBV et de 37,3 % et 36,3 % pour le HSV-2.

A la phase de traitement, la différence entre les taux de détection du CMV ($X^2= 6,90$; $p= 0,009$) et du EBV ($X^2= 6,36$; $p= 0,011$) était statistiquement significative suivant la prise ou non d'un traitement antirétroviral. Pour le HSV-2 ($X^2= 0,17$; $p=0,895$) cette différence n'était pas significative.

La figure 13 ci-dessous présente l'excrétion du CMV, du HSV-2 et du EBV suivant la prise ou non d'un traitement antirétroviral.

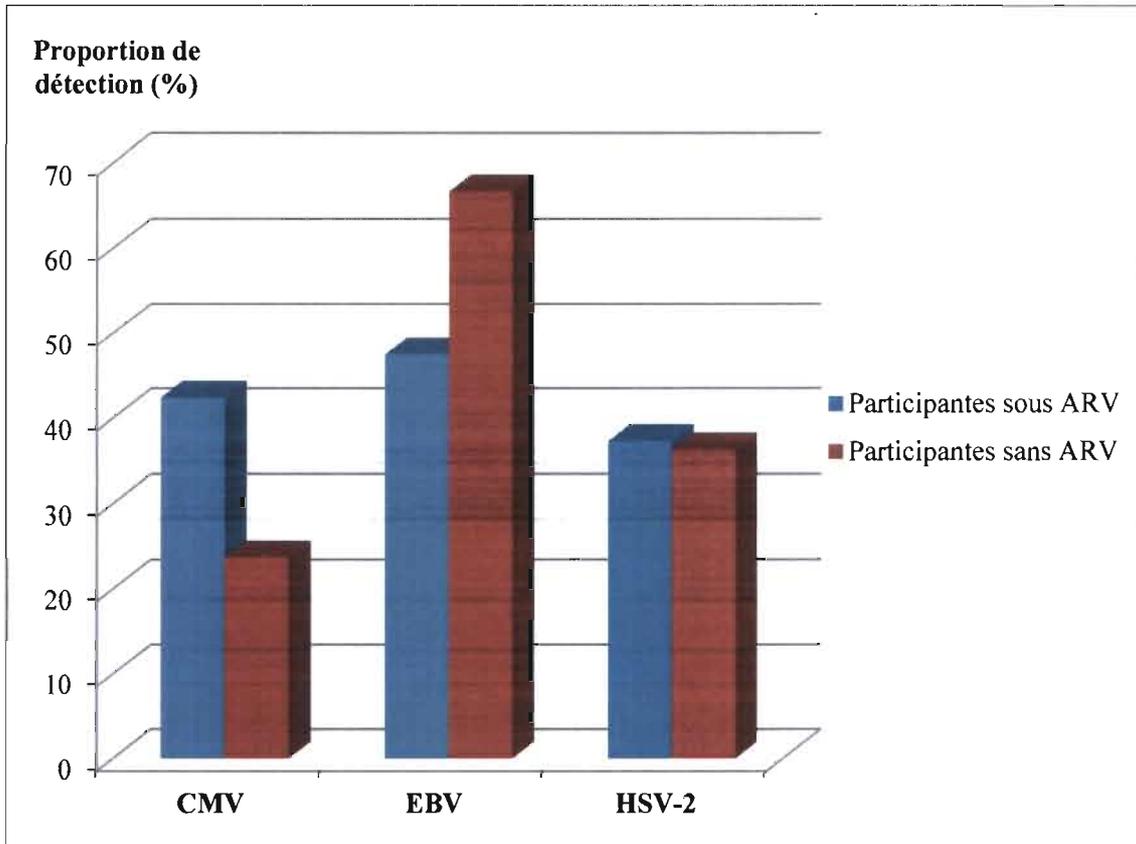


Figure 13: Excrétion du CMV, du EBV et du HSV-2 suivant la prise ou non d'un traitement antirétroviral en phase de traitement antihépatite.

IV.6. Ulcérations génitales et facteurs associés

IV.6.1. Survenue d'une ulcération génitale durant la phase d'observation et facteurs associés (analyse univariée).

A l'analyse univariée au seuil de 30%, les facteurs associés à la survenue d'une ulcération génitale étaient : l'excrétion génitale du EBV (OR= 2,05) et du HSV-2 (OR= 1,47), la vie de couple et l'âge inférieur à 35 ans.

Le tableau II ci-dessous présente les facteurs associés à la survenue d'une ulcération génitale durant la phase d'observation à la régression logistique en analyse univariée.

Tableau II: Association entre la présence d'une ulcération génitale et les caractéristiques des participantes à la phase d'observation (résultats de la régression logistique univariée).

Variables	Odds Ratio (OR)	IC 95%	P value
Caractéristiques sociodémographiques			
Age			
16- 34 ans	2,80	[1,33- 5,92]	0,006
≥ 35 ans	1		
Niveau instruction			
Aucun	1		0,9863
Primaire	0,96	[0,44- 2,10]	
Secondaire	1,03	[0,47- 2,26]	
Profession			
Professionnel du sexe	1,37	[0,48- 3, 88]	0,7543
Serveuses de bar	0, 85	[0,35- 2,03]	
Autres	1		
Statut matrimonial			
Mariée ou vivant en couple	0,57	[0,24- 1,32]	0,1913
Célibataire/Divorcée/Séparée/Veuve	1		
Caractéristiques cliniques et thérapeutiques			
Stade OMS			
Stade 1	1		0,36
Stade 2	1,65	[0,70 -3,89]	
Stade 3 et 4	1,64	[0,77 -3,51]	
Traitement ARV en cours			
Oui	1,01	[0,50-2,05]	0,9719
Non	1		
Caractéristiques biologiques			
CD4			
<200	1		0,3617
200-500	1,03	[0,34- 3,06]	
>500	1,67	[0,54- 5,15]	
Excrétion HSV-2			
Oui	1,47	[0,77- 2,82]	0,2443
Non	1		
Excrétion CMV			
Oui	1,14	[0,53- 2,45]	0,7266
Non	1		
Excrétion EBV			
Oui	2,05	[0,97- 4,34]	0,0609
Non	1		

IV.6.2. Survenue d'une ulcération génitale durant la phase d'observation et facteurs associés (analyse multivariée).

A l'analyse multivariée, un âge inférieur à 35 ans était associé à un risque élevé de survenue d'une ulcération génitale durant la phase d'observation (OR= 2,75 ; IC95 % [1,27-5,93]). Le tableau ci-dessous présente les résultats de l'analyse multivariée.

Tableau III: Association entre la présence d'une ulcération génitale et les caractéristiques des participantes à la phase d'observation (résultats de la régression logistique multivariée).

Variables	Odds ajusté	Ratio	IC 95%	P value
Age				
16- 34 ans	2,75		[1,27-5,93]	0,01
≥ 35 ans	1			
Excrétion HSV-2				
Oui	1,15		[0,58- 2,27]	0,69
Non	1			
Excrétion EBV				
Oui	2,06		[0,97- 4,43]	0,065
Non	1			

IV.6.3. Survenue d'une ulcération génitale durant la phase de traitement et facteurs associés (analyse univariée).

A l'analyse univariée, les facteurs associés à la survenue d'une ulcération génitale durant la phase de traitement antiherpétique au seuil de 30% étaient : l'excrétion génitale du EBV (OR= 3,90; IC95% [1,28-11,84]) et du HSV-2 (OR= 5,63; IC95% [2,22 - 14,28]), la vie en couple, l'âge inférieur à 35 ans, la prise du valaciclovir, la prise d'un traitement antirétroviral.

Le tableau IV ci-dessous présente les résultats de l'analyse.

Tableau IV: Association entre la présence d'une ulcération génitale et les caractéristiques des participantes à la phase de traitement antiherpétique (résultats de la régression logistique univariée).

Variabes	Odds Ratio	IC 95%	p value
Caractéristiques sociodémographiques			
Age			
16- 34 ans	2,24	[0,85-5,89]	0,1025
≥ 35 ans	1		
Niveau instruction			
Aucun	1		0,8899
Primaire	1,07	[0,40-2,85]	
Secondaire	0,82	[0,28-2,36]	
Profession			
Professionnel du sexe	0,82	[0,28- 2,48]	0,8695
Serveuses de bar	0,74	[0,16- 2,85]	
Autres	1		
Statut matrimonial			
Mariée ou vivant en couple	0,41	[0,12-1,45]	0,1667
Célibataire/Divorcée/Séparée/Veuve	1		
Caractéristiques cliniques et thérapeutiques			
Stade OMS			
Stade 1	1		0,549
Stade 2	1,61	[0,57- 4,52]	
Stade 3 et 4	0,92	[0,33-2,52]	
Traitement ARV en cours			
Oui	0,27	[0,079-0,96]	0,0427
Non	1		
Traitement anti herpétique			
Valaciclovir	0,16	[0,05- 0,47]	0,001
Placebo	1		
Caractéristiques biologiques			
CD4			
<200	1		0,6244
200-500	1,44	[0,30-6,84]	
>500	0,04	[0,40- 9,80]	
Excrétion HSV-2			
Oui	5,63	[2,22 - 14,28]	0,000
Non	1		
Excrétion CMV			
Oui	1,15	[0,47-2,84]	0,758
Non	1		
Excrétion EBV			
Oui	3,90	[1,28-11,84]	0,016
Non	1		

IV.6.4. Survenue d'une ulcération génitale durant la phase de traitement et facteurs associés (analyse multivariée).

A l'analyse multivariée, l'excrétion génitale du EBV (OR= 4,82 IC95% [1,01-23,00] p=0,04) et HSV-2 (OR= 3,90 IC95% [1,37-11,13] p=0,01), la prise d'un traitement anti herpétiques et d'un traitement antirétroviral étaient associées à la survenue d'une ulcération génitale à la phase de traitement antiherpétique.

Le Tableau V ci-dessous présente les résultats de l'analyse.

Tableau V: Association entre la présence d'une ulcération génitale et les caractéristiques des participantes à la phase de traitement antiherpétique (résultats de la regression logistique multivariée).

Variables	Odds Ratio ajusté	IC 95%	p value
Statut matrimonial			
Mariée ou vivant en couple	5,44	[0,60- 49,00]	0,13
Célibataire/Divorcée/Séparée/Veuve	1		
Traitement ARV en cours			
Oui	0,25	[0,07 - 0,95]	0,04
Non	1		
Traitement anti herpétique			
Valaciclovir	0,26	[0,08 -0,86]	0,03
Placebo	1		
Excrétion HSV-2			
Oui	3,90	[1,37- 11,13]	0,01
Non	1		
Excrétion EBV			
Oui	4,82	[1,01- 23,00]	0,04
Non	1		

V- DISCUSSION

Notre étude a porté sur des femmes coinfectées par le VIH-1 et le HSV-2, dont la moitié avait plus de 32 ans ; 32,5 % ont présenté au moins un épisode d'ulcération génitale durant les 24 semaines de suivi. Ces épisodes étaient moins fréquents durant la phase de traitement antiherpétique.

Les trois virus étaient détectés à toutes les phases de l'étude. Les taux de détection du CMV, du EBV et du HSV-2 étaient plus élevés chez les participantes qui ont présenté des ulcérations génitales quel que soit la phase de l'étude.

La survenue d'une ulcération génitale était associée à la détection du HSV-2 et du EBV dans le LCV ce qui ne s'est pas vérifié pour le CMV. Le valaciclovir et le traitement antirétroviral avaient un rôle protecteur contre les épisodes d'ulcération génitale.

Au moins un épisode d'ulcération génitale a été noté chez 63 personnes. Ces ulcérations sont survenues majoritairement durant la phase d'observation. La diminution des épisodes durant la phase de traitement pourraient s'expliquer par l'activité antiherpétique du valaciclovir et confirme l'indication de ce médicament dans le traitement suppressif des récurrences de l'herpès génital (Whitley et Roizman, 2001).

Le HSV-2, le CMV et le EBV ont été détectés chez près de 92 % des participantes en prenant en compte les deux phases de l'étude. Le EBV était majoritairement détecté quel que soit la phase. On notait une différence significative entre les taux de détection des trois virus suivant la phase de l'étude. L'excrétion génitale du CMV augmentait lors de la phase de traitement antiherpétique. Par contre le traitement antiherpétique diminuait significativement l'excrétion génitale du HSV-2 et du EBV et par conséquent, diminuait le risque de survenue d'une ulcération génitale.

En phase d'observation, le EBV était détecté dans près de 66,5 % des cas. Peu d'études se sont intéressées à la recherche du EBV dans le LCV. Silver et al. en 2011 en Inde notaient la présence de l'ADN du EBV dans 20% des écouvillonnages du col utérin chez 464 femmes.

Pour ce qui est du CMV, il était détecté chez environ 23 % des participantes en phase d'observation. Clarke et al., en 1996 détectaient le CMV chez 19,6% des femmes infectées par le VIH. Egalement Ross et al. en 2005 dans une étude portant sur l'association entre vaginose bactérienne et la présence du CMV dans le tractus génital féminin trouvait que 36,7 % des femmes excrétaient le CMV et cette excrétion était significativement liée à la présence d'une vaginose bactérienne. Quant au HSV-2, il était détecté chez 46 % de nos patientes en phase d'observation. Nos résultats sont proches de ceux de LeGoff et al. en 2007 qui notaient 37% de détection chez des femmes coinfectées par le VIH-1 et le HSV-2.

Nos taux de détection plus élevés que ceux des autres études pourraient s'expliquer par le matériel biologique utilisé (LCVe) et la série d'une à trois mesures alors que la majorité des études ont portés sur des écouvillons génitaux et en une seule mesure. Le fait que ces virus ne soient pas excrétés en continue montre la nécessité de plusieurs mesures espacées dans le temps pour une meilleure détection.

Les proportions de détection des virus chez les participantes variaient suivant la prise du valaciclovir ou du placebo. Comparativement au groupe placebo, les taux de détection des trois virus étaient plus faibles dans le groupe valaciclovir. Cette différence n'était pas significative pour le CMV. L'activité antiherpétique du valaciclovir pourraient expliquer cette diminution de l'excrétion génitale des virus (Hasegawa et al., 2001 ; Chakrabarty et al., 2005).

Dans cette étude, nous avons mis en évidence une fréquence élevée des coinfections d'herpès virus. En effet Plus de 63 % des participantes avaient une coinfection. Cela s'expliquerait par la forte prévalence de ces virus dans la population et aussi de la fréquence de l'excrétion de ces virus dans le tractus génital (Henle et al., 1968 ; Fry, 2001 ; Cannon et al., 2010).

Les ulcérations génitales survenaient le plus souvent chez les participantes qui excrétaient les virus quelques soit la phase de l'étude. Legoff et al., en 2007 faisait le même constat en étudiant l'excrétion génitale du HSV-2 et du VIH-1 durant les épisodes d'ulcérations.

Cette différence de détection des virus n'était pas significative durant la phase d'observation. Les taux de détection plus élevées au cours des ulcérations génitales pourraient s'expliquer par le fait que l'ulcération serait la conséquence de la réactivation des virus.

La détection du CMV et du EBV dans le LCVe conforte les hypothèses de la transmission de ces virus aux partenaires sexuels lors des rapports sexuels (Lisco et al., 2012 ; Kaspersen et al., 2013).

La survenue d'une ulcération génitale n'était pas associée à l'excrétion du CMV. Cette situation pourrait s'expliquer par l'homogénéité de notre population par rapport au statut VIH et au statut immunitaire. Clarke et al., en 1996 notaient que l'excrétion génital du CMV chez les femmes infectées par le VIH était fortement associée au nombre des lymphocytes CD4 et le risque d'excrétion était multiplié par 6 chez les femmes qui avaient un taux de CD4 inférieur à 200/ul comparativement aux femmes non infectées par le VIH.

Les épisodes d'ulcération génitale ont été associés à détection du HSV-2 et du EBV dans le LCVe. L'excrétion de ces deux virus augmentait significativement de 1,15 à 5 fois le risque de développer une ulcération génitale suivant les phases de l'étude. Ce risque était plus élevé durant la phase du traitement antiherpétique et s'expliquerait par l'effet protecteur du valaciclovir.

L'absence d'études prospectives sur le rôle du CMV et du EBV dans la survenue des ulcérations génitales ne nous permet pas de faire des comparaisons. Les études portant sur l'incrimination de ces deux virus dans l'induction des ulcérations sont des séries de cas qui ont été rapportées.

L'effet protecteur du traitement antirétroviral et du valaciclovir dans la survenue des ulcérations génitales a été constaté au cours de cette étude surtout à la phase de traitement. Ces résultats confirment l'activité du valaciclovir sur les herpès virus (Hasegawa et al., 2001 ; Chakrabarty et al., 2005).

Le traitement ARV protégeant contre la survenue d'une ulcération et l'excrétion des virus pourrait s'expliquer d'une part par la restauration de l'immunité et d'autre part, par sa considération comme un facteur de confusion avec le traitement antiherpétique. Cette protection du traitement antirétroviral lors de la phase de traitement antiherpétique soulève la question d'une possible synergie d'action entre ces médicaments.

CONCLUSION

Cette étude exploratoire nous a permis d'évaluer l'excrétion génitale des herpès virus tels le CMV, le EBV et le HSV-2 dans le LCVe par la PCR en temps réel et la survenue d'une ulcération génitale chez 194 femmes coinfectedes par le VIH-1 et HSV-2. Le HSV-2, le CMV et le EBV ont été détecté chez 92% des participantes avec une fréquence élevée des coinfections herpétique. Au moins un épisode d'ulcérations génitales a été noté chez 63 personnes et le nombre d'épisodes variait de 1 à 5.

La présente étude confirme l'activité antiherpétique du valaciclovir avec la diminution du nombre des épisodes d'ulcération et de la fréquence de l'excrétion génitale des virus. Elle souligne aussi la difficulté du diagnostic étiologique des ulcérations génitales chez les personnes infectées par le VIH avec la diminution des étiologies bactériennes (OMS 2007) et la nécessité d'un traitement étiologique des ulcérations génitales tout en tenant compte du EBV malgré la prépondérance du HSV-2.

Notre étude la première du genre au Burkina fait la preuve de la présence de l'ADN du CMV, du EBV et du HSV-2 dans les sécrétions génitales féminine et donc de leur possible transmission sexuelle. La survenue d'une ulcération génitale a été fortement associée à la détection du EBV et du HSV-2 dans le LCVe. L'excrétion de ces deux virus augmentait le risque de survenue d'une ulcération génitale.

La prévalence élevée des coinfections à herpès virus nécessite des études prospectives portant sur l'impact de ces coinfections sur l'évolution naturelle de chaque virus à la recherche d'une possible synergie d'action ou d'une inhibition dans la pathogénèse de ces virus.

Au terme de cette étude portant sur le diagnostic étiologique des ulcérations génitales et au vu des résultats, nous recommandons :

- Le renforcement des capacités opérationnelles des laboratoires pour un meilleur diagnostic des IST virales ;
- Le diagnostic étiologique des IST pour un traitement étiologique ;
- La prise en compte du EBV dans le diagnostic étiologique des ulcérations génitales.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- **Ameziane N, Bogard M, et Lamoril J.** Principes de biologie moléculaire en biologie clinique. Elsevier. 2006; 705 pages.
- **Aryee EA, Bailey RL, Natividad-Sancho A, et al.** Detection, quantification and genotyping of Herpes Simplex Virus in cervicovaginal secretions by real-time PCR: a cross sectional survey. *Virology Journal*. 2005; 2(61):10p.
- **Babcock GJ, Decker LL, Volk M, et al.** EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity*. 1998; 9: 395-404.
- **Behets FM, Brathwaite AR, Hylton-Kong T, et al.** Genital ulcers: etiology, clinical diagnosis, and associated human immunodeficiency virus infection in Kingston, Jamaica. *Clin Infect Dis*. 1999; 28(5): 1086-90.
- **Berges BK, et Tanner A.** Modelling of human herpes virus infections in humanized mice. *The Journal of general virology*. 2014; 95 (Pt 10):2106-17. Epub 2014/07/24.
- **Binnicker MJ, et Espy ME.** Comparison of Six Real-Time PCR Assays for Qualitative Detection of Cytomegalovirus in Clinical Specimens. *J Clin Microbiol*. 2013; 51(11): 3749-3752.
- **Birdsong M, Corey JH, Mitchell FN, et al.** Generalized cytomegalic inclusion disease in new born infants. *J Am Med Assoc*. 1956 Dec; 162(14): 1305-8.
- **Brengel-Pesce K, Morand P, Schmuck A, et al.** Routine use of real-time quantitative PCR for laboratory diagnosis of Epstein-Barr virus infections. *J Med Virol*. 2002 Mar; 66 (3):360-9.
- **Bruisten SM.** Genital ulcer in women. *Curr Womens Health Rep*. 2003; 3: 288-98.
- **Caliendo AM, Schuurman R, Yen-Lieberman B, et al.** Comparison of quantitative and qualitative PCR assays for cytomegalovirus DNA in plasma. *J Clin Microbiol*. 2001; 39: 1334-1338.
- **Cannon MJ, Schmid DS, et Hyde TB.** Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol*. 2010; 20(4): 202-13.
- **Chakrabarty A, Anderson NJ, Beutner R, et al.** Valacyclovir for the management of herpes viral infections. *Skin therapy letter*. 2005; 10(1): 1-4.
- **Chastel C.** La chimiothérapie antivirale de l'herpès : une valeur d'exemple en chimiothérapie (éditorial). *Virologie* 4 (n° spécial) 2000 ; 4-6.
- **Chen DH, Jiang H, Lee M, et al.** Three-dimensional visualization of tegument/capsid interactions in the intact human cytomegalovirus. *Virology*. 1999; 260(1): 10-6.

- **Chen T, et Hudnall SD.** Anatomical mapping of human herpes virus reservoirs of infection. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2006; 19 (5):726-37. Epub 2006/03/11.
- **Clarke LM, Duerr A, Feldman J, et al.** Factors associated with cytomegalovirus infection among human immunodeficiency virus type I seronegative and seropositive women from an urban minority community. *JID.* 1996; 173: 77-82.
- **Cohen J.** Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med.* 2000; 343: 481-92.
- **Dauden E, Fernandez-Buezo G, Fraga J, et al.** Mucocutaneous presence of cytomegalovirus associated with human immunodeficiency virus infection: discussion regarding its pathogenetic role. *Arch Dermatol.* 2001; 137(4): 443-8.
- **Davison AJ.** Evolution of sexually transmitted and sexually transmissible human herpes viruses. *Ann. N.Y. Acad. Sci. Issue: The Evolution of Infectious Agents in Relation to Sex:* 2012; 1230: E37–E49.
- **Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, et al.** The order Herpesvirales. *Arch.Virol.* 2009; 154: 171–7
- **Descamps V, Bouscarat F et Picard-Dahan C.** Herpès. *Encycl Méd Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris, tous droits réservés), Dermatologie,* 8-052-A-10. 1997.
- **Drouet E, Gafa V, LeRoy E, et al.** L'immunosubversion liée au cytomégalovirus humain. *Virologie.* 2002; 6: 417-30.
- **Engelkens HJH, et Stoltz E.** Genital ulcer disease. *Int J Dermatol.*1993; 169-81.
- **Fillet AM, Sénéchal B, Challine-Lehman D, et al.** Infection à cytomégalovirus. *Hématologie.* Janvier-Février 2000; 6(1): 46-65.
- **Fry DE.** Herpesviruses: emerging nosocomial pathogens? *Surg Infect (Larchmt).* 2001; 2(2): 121-132.
- **Gallant JE, Moore RD, Richman DD, et al.** Incidence and natural history of cytomegalovirus disease in patients with advanced human immunodeficiency virus disease treated with zidovudine. The Zidovudine Epidemiology Study Group. *J Infect Dis.* 1992; 166(6): 1223-7.
- **Gandhi MK, et Khanna R.** Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *Lancet Infect Des.* 2004; 4: 725-38.

- **Gleaves CA, Wilson DJ, Wold AD, et al.** Detection and serotyping of herpes simplex virus in MRC-5 cells by use of centrifugation and monoclonal antibodies 16 h post inoculation. *J Clin Microbiol.* 1985; 21: 29-32.
- **Gradilone A, Vercillo R, Napolitano M, et al.** Prevalence of human papillomavirus, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus in the cervix of healthy women. *J Med Virol* 1996; 50 (1): 1-4.
- **Grefte JM.** The lower matrix protein pp65 is the principal viral antigen present in the peripheral blood leukocytes during active cytomegalovirus infection. *J Gen Virol.* 1992; 73: 2923-2932.
- **Halvorsen J, Brevig T, Aas T, et al.** Genital ulcers as initial manifestation of Epstein-Barr virus infection: two new cases and a review of the literature. *Acta Derm Venereol.* 2006 ; 86 (5): 439-42.
- **Hantz S, Mazon MC, Alain S, et al.** Traitement des infections à cytomégalo­virus humain (CMV). *Médecine Thérapeutique.* juillet-août-septembre 2009 ; 115 (3): 211-222.
- **Hasegawa T, Kawana T, Okuda T, et al.** Susceptibility to acyclovir of herpes simplex virus isolates obtained between 1977 and 1996 in Japan. *J Med Virol.* 2001; 63(1): 57-63.
- **Henle G, Henle W, et Diehl V.** Relation of Burkitt's tumor associated herpes type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1968; 59(1): 94-101.
- **Hope-Rapp E, Anyfantakis V, Fouere S, et al.** Etiology of genital ulcer disease. A prospective study of 278 cases seen in an STD clinic in Paris. *Sex Transm Dis.* March 2010; 37(3): 153-8.
- **Hudnall SD, Stanberry LR et Griffiths PD.** Human herpesvirus infections. *Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens and Practice.* 3rd edition. Elsevier; 2011.
- **Jerdan K, Aronson I, Hernandez C, et al.** Genital ulcers associated with Epstein-Barr virus. *Cutis.* 2013; 91(6): 273-6.
- **Kalichman S, Pellowski J, et Turner C.** Prevalence of sexually transmitted co-infections in people living with HIV/AIDS: systematic review with implications for using HIV treatments for prevention. *Sex Transm Infect.* 2011; 87: 183-90.
- **Kaspersen MD, et Hollsberg P.** Seminal shedding of human herpesviruses. *Virol J.* 2013; 10: 226.
- **Kathleen MS.** Dermatological conditions and noninfectious genital ulcers in sexually transmitted diseases. R. H. Beigi. John Wiley & Sons, Ltd. 2012: 104-115.
- **Koelle D, et Wald A.** Herpes simplex virus: the importance of asymptomatic shedding. *J Antimicrob Chemother.* 2000; 45(Suppl T3): 1-8.

- **Kondo K, Kaneshima H, et Mocarski ES.** Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91(25): 11879-83.
- **Kuijpers TW, Vossen MT, Gent MR, et al.** Frequencies of circulating cytolytic. CD45RA+CD27-, CD8+ T lymphocytes depend on infection with CMV. *J Immunol.* 2003 ; 170 (8): 4342-8.
- **Laurent R.** Herpès. *Encycl Méd Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris, tous droits réservés), Dermatologie, 98-290-A-10, 2002, 11 p.*
- **LeGoff J, Weiss HA, Gresenguet G, et al.** Cervicovaginal HIV-1 and herpes simplex virus type 2 shedding during genital ulcer disease episodes. *AIDS.* 2007; 21: 1569-1578.
- **Lepiller Q, Fafi-Kremer S, Stoll-Keller Fo, et al.** Cytomegalovirus humain et cancers *Virologie* 2012; 16 (5): 315-29.
- **Leruez-Ville M, et Rouzioux C.** Le diagnostic virologique de l'infection à Cytomégalovirus humain. *Médecine thérapeutique.* 2001 ; 7(8) : 605-10.
- **Liebowitz D.** Epstein-Barr virus and a cellular signaling pathway in lymphomas from immunosuppressed patients. *N Engl J Med.* 1998; 338: 1413-1421.
- **Lisco A, Munawwar A, Introini A, et al.** Semen of HIV-1 infected individuals: local shedding of herpes viruses and reprogrammed cytokine network. *J Infect Dis.* 2012 January; 205(1): 97-105.
- **Mostad SB, Kreiss JK, Yncarz AJ, et al.** Cervical shedding of cytomegalovirus in human immunodeficiency virus type 1 infected women. *J Med Virol.* Dec1999; 59(4): 469-73.
- **Munday PE, et Mullan HM.** Clinical uses of herpes simplex virus type-specific serology *Int J STD AIDS.* 2001; 12: 784-788
- **Nagot N, Ouangré A, Ouedraogo A, et al.** Spectrum of commercial sex activity in Burkina Faso: classification model and risk of exposure to HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2002; 29(5): 517-21.
- **Nagot N, Foulongne V, Becquart P, et al.** Longitudinal assessment of HIV-1 and HSV-2 shedding in the genital tract of West African women. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005; 39(5): 632-4.
- **Nagot N, Ouedraogo A, Foulongne V, et al.** Reduction of HIV-1 RNA levels with therapy to suppress herpes simplex virus. *N Engl J Med.* 2007; 356 (8): 790-9.
- **Naher H, Gissmann L, Freese UK, et al.** Subclinical Epstein-Barr virus infection of both the male and female genital tract: indication for sexual transmission. *J Invest Dermatol.* 1992; 98: 791-793.

- **Nicholas J.** Evolutionary aspects of oncogenic herpes viruses. *J Clin Pathol: Mol Pathol.* 2000; 53(:222-237).
- **O'Connor CM, et Murphy EA.** A myeloid progenitor cell line capable of supporting human cytomegalovirus latency and reactivation, resulting in infectious progeny. *Journal of Virology.* September 2012; 86 (18): 9854 -65.
- **O'Farrell N.** Targeted interventions required against genital ulcers in African countries worst affected by HIV infection. *Bulletin of the World Health Organization.* 2001; 79:569-577.
- **O'Farrell N.** Increasing prevalence of genital herpes in developing countries: implications for heterosexual HIV transmission and STI control programmes. *Sex Transm Infect.* 1999; 75(6): 377-84.
- **Organisation Mondiale de la Santé (OMS).** Global strategy for the prevention and control of sexually transmitted infections: 2006-2015: breaking the chain of transmission. *Organisation Mondiale de la Santé* 2007.
- **Ouédraogo A, Nagot N, Vergne L, et al.** Impact of suppressive herpes therapy on genital HIV-1 RNA among women taking antiretroviral therapy: a randomized controlled trial. *AIDS.* 2006; 20(18): 2305-13.
- **Pass RF.** Congenital cytomegalovirus infection and hearing loss. *Herpes.* 2005; 12(2): 50-5.
- **Paz-Bailey G, Rahman M, Chen C, et al.** Changes in the etiology of sexually transmitted diseases in Botswana between 1993 and 2002: implications for the clinical management of genital ulcer disease. *Clin Infect Dis.* 2005; 41(9): 1304-12.
- **Perera RA, Samaranayake LP, et Tsang CS.** Shedding dynamics of Epstein-Barr virus: A type 1 carcinogen. *Arch Oral Biol.* 2010; 55(9): 639-47.
- **Phiri S, Zadrozny S, Weiss HA, et al.** Etiology of genital ulcer disease and association with HIV infection in Malawi. *Sex Transm Dis.* 2013; 40(12): 923-8.
- **Pinotti JA, Miranda SD, Maestri CA, et al.** Genital ulcers na Mulher. *Rev Gin Obstet.* 1998; 1: 46-53.
- **Poitras E, et Houde A.** La PCR en temps réel : principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology.* 2002 Dec; 2(2): 2-11.
- **Ranjit T, Macsween KF, McAulay K, et al.** Evidence of Shared Epstein-Barr Viral Isolates Between Sexual Partners, and Low Level EBV in Genital Secretions. *Journal of Medical Virology* 2006; 78: 1204-1209.
- **Risbud A, Chan-Tack K, Gadkari D, et al.** The etiology of genital ulcer disease by multiplex polymerase chain reaction and relationship to HIV infection among patients attending sexually transmitted disease clinics in Pune, India. *Sex Transm Dis.* 1999; 26(1): 55- 62.

- **Ross SA, Novak Z, Ashrith G, et al.** Association between genital tract cytomegalovirus infection and bacterial vaginosis. *JID*. 2005; 192: 1727–30.
- **Ross SA, Novak Z, Pati S, et al.** Diagnosis of cytomegalovirus infections. *Infect Disord Drug Targets*. 2011; 11(5): 466-474.
- **Rozenberg F.** Physiopathologie de l'infection à virus herpès simplex. *Virologie 4* (n° spécial). 2000 ; 7-14.
- **Saurat JH, Lachapelle JM, Lipsker D, et al.** Dermatologie et infections sexuellement transmissibles. 5^é édition Elsevier Masson. 2009 : 1152p
- **Seigneurin JM.** Infections à virus Epstein-Barr. *Encycl Méd Chir* (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris, tous droits réservés) Maladies infectieuses 8-070-K-10, 2001, 12 p.
- **Seigneurin JM, Fafi-Kremer S, Baccard M, et al.** Le Virus Epstein-Barr et les marqueurs de l'infection. *Bioforma Cahier de formation Biologie médicale*. 2006; n° 36.
- **Sewell CA, et Anderson JR.** Cytomegalovirus disease in the lower female genital tract. *AIDS Patient Care STDS*. 2001; 15(9): 459-62.
- **Silver MI, Paul P, Sowjanya P, et al.** Shedding of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus from the genital tract of women in a periurban community in Andhra Pradesh, India. *J Clin Microbiol*. 2011 Jul; 49(7): 2435-9.
- **Sinclair J, et Sissons P.** Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol*. 2006; 87(Pt 7): 1763-79.
- **Slyker J, Farquhar C, Atkinson C, et al.** Compartmentalized cytomegalovirus replication and transmission in the setting of maternal HIV-1 infection. *Clin Infect Dis*. 2014 Feb ; 58(4): 564-72.
- **Stephan JL, Galambrun C, et Pozetto B.** Les infections par le virus d'Epstein-Barr. *Médecine thérapeutique / Pédiatrie*. Mai - Juin 2000 ; 3(3): 176-85.
- **Straus SE, Cohen JI, Tosato G, et al.** NIH conference. Epstein-Barr virus infections: biology, pathogenesis, and management. *Ann Intern Med*. 1993; 118: 45-58.
- **Strick LB, et Wald A.** Diagnostics for Herpes Simplex Virus: Is PCR the New Gold Standard? *Mol Diag Ther*. 2006; 10(1): 17-28.
- **Tanaka N.** Quantitative analysis of cytomegalovirus load using a real-time PCR assay. *J Med Virol*. 2000; 60: 455-462.
- **Thouvenot D, Najioullah F, Morfin F, et al.** Apport du laboratoire dans le diagnostic des infections à virus herpès simplex. *Virologie*. Novembre - Décembre 1998 ; 2 (6): 451-7.

- **Ward H, et Ronn M.** Contribution of sexually transmitted infections to the sexual transmission of HIV. *Curr Opin HIV AIDS*. July 2010; 5(4): 305-10.
- **Weller TH.** The Cytomegaloviruses: ubiquitous agents with protean clinical manifestations. *N Engl J Med*. 1971 Jul 22; 285(4): 203-214.
- **White DW, Beard RS, et Barton ES.** Immune modulation during latent herpesvirus infection. *Immunol Rev*. 2012; 245(1): 189-208.
- **Whitley RJ, et Roizman B.** Herpes simplex virus infection. *Lancet*. 2001; 357: 1513-1518.

ANNEXES

Annexe 1 : Extraction d'ADN à partir de lavages cervico-vaginaux enrichi (LCVe)

Cette étape est réalisée dans la salle d'extraction : Salle BM1

- **Responsables** : techniciens et responsable du laboratoire Mixte de Biologie Moléculaire.

- **Matériel**

- Kit d'extraction QIAmp DNA Mini Kit Handbook (Qiagen)
- Ethanol absolu Normapur
- H₂O qualité biologie moléculaire (Eurobio, Eppendorf)
- Micropipettes P10, P20, P200, P1000
- Cônes à filtre (uniquement)
- Centrifugeuse pour microtubes 1.5 ml
- Bain Marie
- Javel, éthanol 70% pour nettoyage
- Tubes 1.5 ml, 2 ml
- Tubes 15 ml
- Gants
- Blouse (exclusivement utilisée en salle d'extraction)
- Réfrigérateur -20°C (conservation éluât, protéase)

- **MODE OPÉRATOIRE SELON LE FABRICANT**

- **Préparation des échantillons**

Faire une liste des échantillons (LCV) à extraire. Les sortir du -80°C et les décongeler.

- **Extraction de l'ADN par le kit QIAmp DNA Mini Kit Handbook (Qiagen)**

Avant extraction

Equilibrer les échantillons à température ambiante.

Allumer le bain-marie à +56°C pour l'étape 4.

S'assurer que les tampons AW1 (éthanol), AW2 (éthanol) et la protéase (conservée à -20°C) ont été préparés

- AW1 : AW1 concentré (95 ml) + 125 ml d'éthanol absolu. Homogénéiser. Noter sur la bouteille ☒ que le tampon a été repris avec l'éthanol.
- AW2 : AW2 concentré (66 ml) + 160 ml d'éthanol absolu Homogénéiser. Noter sur la bouteille ☒ que le tampon a été repris avec l'éthanol.
- Protéase
 - Qiagen : déjà dilué

- Merck les 100 mg doivent être repris à 20 mg/ml (600 mAU/ml) dans de l'eau de qualité biologie moléculaire, homogénéisés, aliquotés et conservés à -20°C

Si le tampon AL forme des précipités, le dissoudre en incubant à 56°C .

Tous les tampons du kit doivent être aliquotés lors de l'utilisation (tube 15 ml).

Toutes les centrifugations doivent être réalisées à température ambiante.

Préparer les colonnes et les annoter du numéro de l'échantillon, ainsi que les eppendorfs pour récupérer l'éluât.

Procédure d'extraction

1. Pipeter 20 μl de protéase (ou protéinase K, 20 mg/ml) et déposer dans un tube 1,5 ou 2 ml.
2. Ajouter 200 μl d'échantillon (LCV).
3. Ajouter 200 μl de tampon AL à l'échantillon. Vortexer environ 15 s.
4. Incuber 10 mn au bain-marie à 56°C .

Une incubation plus longue n'a pas d'effet sur la qualité de l'ADN.

5. Centrifuger brièvement (pour éviter toutes projections).
6. Ajouter 200 μl d'éthanol (96-100%) à l'échantillon, et vortexer environ 15 s. Puis centrifuger brièvement (pour éviter toutes projections).
7. Appliquer le mélange de l'étape 6 sur la colonne avec un tube de collection de 2 ml. Centrifuger à 6000g (8000rpm) pendant 1 mn. Placer la colonne dans un tube de collection de 2 ml propre et jeter le tube avec le filtrat.
8. Ajouter 500 μl de tampon AW1 (avec éthanol). Ne pas toucher les rebords si l'on veut utiliser le même cône pour tous les échantillons. Centrifuger à 6000g (8000rpm) pendant 1 mn. Placer la colonne dans un nouveau tube de collection de 2 ml propre et jeter le tube avec le filtrat.
9. Ajouter 500 μl de tampon AW2 (avec éthanol). Ne pas toucher les rebords si l'on veut utiliser le même cône pour tous les échantillons. Centrifuger à la vitesse maximum de la centrifugeuse pendant 3 mn.
Facultatif : centrifuger 8000 rpm 1 mn, avec la colonne vide dans un nouveau tube de collection pour éliminer le reste d'éthanol
10. Placer la colonne dans un eppendorf de 1,5 ml référencé (N° échantillon, ADN, date d'extraction). Ajouter 100 μl de tampon d'éluat AE ou H₂O. Incuber 1 mn à température ambiante, et centrifuger à 8000rpm pendant 2 mn
11. Conserver l'ADN extrait $-20^{\circ}\text{C}/-80^{\circ}\text{C}$.

Annexe 2: Amplification d'ADN extrait à partir de lavages cervico-vaginaux (LCV)

1. Préparer le mix (dans une zone protégée d'amplicons)

- Vortexer délicatement le mix.
- Prendre une plaque de 96 puits par les côtés et déposer uniquement sur le portoir noir.
- Ne jamais poser la plaque sur la paillasse, ne pas écrire sur la plaque (Attention aux poussières et encre: émission de fluorescence).
- Faire un plan de plaques

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	T+	T-	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄	E ₅
B	E ₆	E ₇	E ₈	E ₉	E ₁₀	E ₁₁	E ₁₂	E ₁₃	E ₁₄	E ₁₅	E ₁₆	E ₁₇
C	E ₁₈	E ₁₉	E ₂₀	E ₂₁	E ₂₂	E ₂₃	E ₂₄	E ₂₅	E ₂₆	E ₂₇	E ₂₈	E ₂₉
D	E ₃₀	E ₃₁	E ₃₂	E ₃₃	E ₃₄	E ₃₅	E ₃₆	E ₃₇	E ₃₈	E ₃₉	E ₄₀	E ₄₁
E	E ₄₂	E ₄₃	E ₄₄	E ₄₅	E ₄₆	E ₄₇	E ₄₈	E ₄₉	E ₅₀	E ₅₁	E ₅₂	E ₅₃
F	E ₅₄	E ₅₅	E ₅₆	E ₅₇	E ₅₈	E ₅₉	E ₆₀	E ₆₁	E ₆₂	E ₆₃	E ₆₄	E ₆₅
G	E ₆₆	E ₆₇	E ₆₈	E ₆₉	E ₇₀	E ₇₁	E ₇₂	E ₇₃	E ₇₄	E ₇₅	E ₇₆	E ₇₇
H	E ₇₈	E ₇₉	E ₈₀	E ₈₁	E ₈₂	E ₈₃	E ₈₄	E ₈₅	E ₈₆	E ₈₇	E ₈₈	E ₈₉

- Distribuer 15 µl de mix par puits.
- Ajouter 5 µl de l'échantillon ou de la gamme (salle d'extraction).
- Homogénéiser en déposant.
- Appliquer un film transparent sur la plaque (avec applicateur) et enlever les 2 languettes. (Ne pas poser ses doigts ni sur le film, ni sur le fond de la plaque.
- De préférence mettre le blanc à la fin.
- S'assurer qu'il n'y ait pas de bulles au fond des puits, dans le cas contraire, tapoter la plaque (toujours dans son portoir noir) pour la remontée des bulles.
- Transférer la plaque fermée sur le portoir noir de transfert PCR1 ⇒ PCR2.

2. Lancement d'un run de PCR en temps réel (Appareillage ABI7000® / technologie TaqMan)

2.1 Allumage appareil-ordinateur (pas d'ordre d'allumage).

Placer l'isolant : face marron vers le dessus.

Ouvrir la porte de l'appareil délicatement (la faire glisser vers le fond tout en la retenant).

Placer la plaque + isolant dans l'appareil : **A1 de la plaque à gauche vers le haut.**

Fermer, **la porte devant être impérativement retenue lors de sa fermeture** (le miroir se trouvant derrière la porte).

2.2 Ouvrir le programme ABI Prism 7000 SDS Software (sur le bureau de l'ordinateur)

File New Assay: absolute quantification
Container: 96-well clear
Template : **Quantif CMV (EBV ou HSV-2)**
OK

Correspondances des différents onglets

Set up

Plan de plaque

Sélectionner les barrettes/puits utilisés. Shift, double clique, cocher

Add detector

Cliquer sur Quantif FAM/TAMRA

Add to plate doc

Done

Use

On peut soit entrer les noms des échantillons à cette étape, soit lancer le run et entrer les noms ensuite (voir 4.3). S'assurer que tous les puits utilisés ont été bien sélectionnés (carré rose).

Instrument Programme

Vérifier les conditions du programme CMV (EBV ou HSV)

45 cycles 95°C 10 min (Activation Taq)

95°C 10 sec (Dénaturation)

60°C 45 sec Hybridation + Elongation avec acquisition de fluorescence en fin d'élongation (F1/F2)

Vérifier le volume final de l'échantillon (25µl), le protocole (9600 emulsion (pour TaqMan)).

Sauvegarder l'essai avec la date, dans le dossier HSV ou CMV ou EBV

Cliquer sur run/start

S'assurer que le programme débute

2.3 Entrée des noms des échantillons

Double cliquer sur les puits, attribuer les fonctions à chacun des puits utilisés :

- Standard pour la gamme, noter leur quantification en copies)
- Inconnus (U) : attribuer son nom

- Blanc (NTC : Non Template)

Remarque : si l'on donne un même nom à 2 puits, le programme fera la moyenne des résultats.

2.4 Analyse des résultats

Results Visualisation de l'amplification (sélectionner les puits désirés)

Plate plan de la plaque (standards (S), inconnus (U) et blanc (NTC))

Amplification plot

Baseline

Start cycle: 6

End cycle: 15

Lancer l'analyse

On peut changer la position de la ligne

Dilution de 10 en 10 : 3,32 cycles d'écart

Standard curve

Slope (pente) = efficacité de la PCR

doit être proche de 3,32 (= rendement 100%), si inférieur : problèmes d'inhibition

Intercept = nombre de cycles nécessaires pour détecter 1 copie

R2 = corrélation de points de la gamme, >98%

Report

Fiche de résultats avec les inconnus : copies/ml

Ct : nombre de cycles nécessaire pour obtenir la valeur seuil (threshold)

A imprimer

2.5. Possibilité d'exportation des résultats sur fichier Excel

Export dans Excel :sds (fichier ABI7000)

Results :TXT

Excel Ouvrir (tous les fichiers)

Suivant/virgule Enregistrer sous

Annexe 3: Real-Time PCR CMV Format Hybridation (cible UL83) (Mengelle, M., *et al.*, 2003.; Gouarin, S., *et al.*, 2002; Gault, E., *et al.*, 2001).

Primers (Applied®):

CMV pp65 dir 5'-GTC AGC GTT CGT GTT TCC CA -3' T_m = 62,9°C

CMV pp65 rev 5'-GGG ACA CAA CAC CGT AAA GC -3' T_m = 58,9°C

Taille = 283 bp

0,5 µM de chaque primers (Soit 1µl de chaque primer à 10 pmoles/µl par puits de PCR 20µl)

Sondes (Applied®):

CMV dualab (6-FAM) _ 5'- CCC GCA ACC CGC AAC CCT TCA TG-3' _ (TAMRA)

CMV dualab 0,5 µM (soit 1µl à 10 pmoles/µl)

Appareillage ABI 7000 Applied®/ technologie TaqMan

Mix : TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2x), No AmpErase® UNG (250 réactions)
(Ref Applied 4352042)

Conditions PCR (Programme TaqMan générique)

	Pour 1
Applied Fast Universal PCR Master Mix 2X	10 µl
Amorce CMV pp65 dir	1 µl
Amorce CMV pp65 rev	1 µl
Sonde CMV dualab	1µl
H2O PCR grade	qsp 15µl
	2 µl

- Répartir **15µl** par puits.

- Ajouter 5µl d'éluat de chaque échantillon, plus témoin négatif, plus témoins positifs/ gamme CMV AD 169 quantitated DNA Control (Dilution 10 en 10) 5 points (1,8x10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10²).

- Sceller la plaque avec un film avant de charger L'ABI 7000

Programme d'amplification

95°C pendant 15mn,

95°C 15 s et 60° 1mn pendant 45 cycles

Annexe 4: Real-Time PCR HSV-2 Format TaqMan (cible UL30) (Burrows, J., et al., 2002)

Primers (Eurogentec®).

HSV polF 5'-GCT CGA GTG CGA AAA AAC GTT C -3'

HSV polR 5'- TGC GGT TGA TAA ACG CGG AGT -3'

Taille = 140 pb

0,5 µM de chaque primer (Soit 1µl de chaque primer à 10 pmole/µl par tube de PCR 20µl).

Sonde Taqman (Eurogentec®) :

HSV Taqman : (6-FAM) _ 5'- CCA AGA AAA AGT ACA TCG GCG TCA TCT GCG G-3' _
(TAMRA)

Utilisée à 0,5 µM (soit 1µl à 10 pmole/µl par tube de PCR 20µl)

Appareillage ABI 7000 Applied®/ technologie TaqMan

Mix : TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2x), No AmpErase® UNG (250 reactions)
(Ref Applied 4352042)

Conditions PCR (Programme TaqMan générique)

Pour 1		
Master Mix ABI		10 µl
HSV Pol F (10 pmoles/µl)		1 µl
HSV Pol R (10 pmoles/µl)		1 µl
HSV-Taqman ((10 pmoles/µl)		1µl
H2O PCR grade	qsp 15µl	2 µl

- Répartir **15µl** par puits.

- Ajouter 5µl d'éluât de chaque échantillon, plus témoin négatif, plus témoins positifs/ gamme **HSV-2 GS quantitated DNA Control** (Dilution 10 en 10), 5 points ($1,6 \times 10^6$, 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2).

- Sceller la plaque avec un film avant de charger L'ABI 7000

Programme d'amplification

95°C pendant 15mn,

95°C 15 s et 60° 1mn pendant 45 cycles

Annexe 5: Real-Time PCR EBV TaqMan (cible Thy.kinase gene BXLFI) (Brenzel-Pesce K., *et al.*, 2002 (équipe Seigneurin))

Primers (Applied®):

EBV-dir 5'-GGG GCA AAA TAC TGT GTT AG -3'

EBV-rev 5'- CGG GGG ACA CCA TAG T -3'

Taille = 169bp

0,5 µM de chaque primers (Soit 1µl de chaque primer à 10 pmoles/µl par puits de PCR 20µl)

Sondes (Applied®):

EBV-Dualal 5'- FAM CAG CAT CCA GTC CTG ACT CA -TAMRA -3'

EBV0.5 µM (soit 1µl à 10 pmoles/µl)

Appareillage ABI 7000 Applied®/ technologie TaqMan

Mix : TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2x), No AmpErase® UNG (250 reactions)
(Ref Applied 4352042)

Conditions PCR (Programme TaqMan générique)

	Pour 1
Applied Fast Universal PCR Master Mix 2X	10 µl
Amorce EBV dir	1 µl
Amorce EBV rev	1 µl
Sonde EBV dualab	1 µl
H2O PCR grade qsp 15µl	2 µl

- Répartir 15µl par puits.
- Ajouter 5µl d'éluat de chaque échantillon, plus témoin négatif, plus témoins positifs/ gamme **EBV B95-8 quantitated DNA Control** (Dilution 10 en 10) 5 points ($1,9 \times 10^6$, 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2).
- Sceller la plaque avec un film avant de charger L'ABI 7000

Programme d'amplification

95°C pendant 15mn,

95°C 15 s et 60° 1mn pendant 45 cycles

Annexe 6 : Reconstitution et préparation des réactifs

1. Reconstitution des amorces et sondes CMV, EBV, HSV-2 lyophilisées

Amorces livrées à 10nmoles

Sondes livrées à 6nmoles

a. Préparation de la solution stock (10X= 100pmoles)

- Centrifuger brièvement les tubes
- Ajouter 100 µl de H₂O qualité biologie moléculaire pour les amorces et 60µl pour les sondes
- Vortexer
- Laisser reposer qq mn (environ 5 mn)
- Centrifuger
- Faire des aliquots de 10µl pour avoir une concentration à 10x (100 pmples)
- Conserver à -20°C (solution stock)

b. Préparation de travail (1x = 10pmoles)

- Décongeler un aliquot de 10µl
- Ajouter 90µl de H₂O qualité biologie moléculaire

2. Préparation des standards

Une gamme de standard est préparée à partir du standard fourni par le kit : les standards sont obtenus par le même procédé d'extraction que les échantillons. Une série de dilution en cascade selon une raison géométrique de 10 dans de l'eau qualité Biologie Moléculaire (10µl d'Eluât + 90µl H₂O) permet d'obtenir les cinq points de la gamme du standard : a 10⁶ ; a 10⁵ ; a 10⁴ ; a 10³ ; a 10² copies/ml

- un témoin de reproductibilité (contrôle faiblement positif) par le même procédé d'extraction que les échantillons
- un témoin négatif (NTC, correspondant à de l'eau qualité biologique).

3. Préparation du mix

Le mix est le mélange réactionnel qui permet d'effectuer l'amplification. Il se prépare dans une salle exempte d'amplicon et sa composition est variable (annexe 3, 4, 5). Répartir 15µl du mix préparé dans chaque cupule de la plaque.

- **CMV** : PCR en temps réel par TaqMan ayant pour cible la sous unité longue UL83 utilisant 2 amorces (Applied®) de 283 bp et 0,5µM chacun
- **EBV**: PCR en temps réel par TaqManayant pour cible la thymidine kinase (gène BXL1). Utilise deux primers(Applied®) qui délimitent une séquence de 169 bp du gène BXL1 codant pour la thymidine kinase EBV

- **HSV-2:** PCR en temps réel par TaqMan ayant pour cible la sous unité longue UL38. Utilise deux primers (Applied®) de 140 bp et 0,5µM chacun

4. Amplification

Dans la salle d'amplification répartir selon le plan de plaque (annexe 2) les éluât, les témoins négatif et positif, les 5 points de dilution de la gamme au mix (15µL) préalablement distribué Sceller la plaque avec un film avant de charger L'ABI 7000

- **CMV :** Gamme **CMV AD 169 quantitated DNA Control** (Dilution 10 en 10), 5 points 1,8x (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2).
- **EBV :** Gamme **EBV B95-8 quantitated DNA Control** (Dilution 10 en 10), 5 points 1,9x (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2)
- **HSV-2 :** Gamme **HSV-2 pGEMT quantitated DNA Control** (Dilution 10 en 10). 5 points 1,6x (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2).

Tenir compte des puits prévus pour les gammes et les témoins que l'on mettra après avoir distribué les échantillons.

Mettre en route l'ordinateur couplé à l'ABI Prism7000 et entrer la condition qui correspond à l'amplification prévue. Le programme d'amplification est le même pour les trois virus.

RESUME :

Introduction : En plus du virus de l'herpès simplex de type 2 (HSV-2), d'autres herpes virus humains notamment le virus Epstein Barr (EBV), le cytomégalo virus (CMV) sont aussi incriminés dans la survenue des ulcérations génitales. Cependant, ces virus sont rarement recherchés en pratique courante. **Objectif :** Explorer la relation entre le portage génital des herpes virus (HSV-2, CMV, EBV) et la survenue des ulcérations génitales chez des femmes coinfectedes par le VIH-1 et HSV-2. **Matériel-Méthodes :** Etude de cohorte nichée dans un essai thérapeutique. A chaque visite, un examen gynécologique à la recherche des ulcérations génitales et un prélèvement des sécrétions génitales par lavage cervico-vaginal enrichi d'un écouvillon cervical (LCVe) étaient pratiqués. Extraction (QIAGEN) de l'ADN des virus du LCVe suivie d'amplification (TaqMan). **Résultats :** L'âge médian des 194 participantes était de 32 ans et 30,4 % étaient sous traitement antirétroviraux. 32,5 % ont présentés au moins un épisode d'ulcération génitale durant le suivi. Le HSV-2, le CMV et le EBV ont été détecté chez 92% des participantes. L'excrétion génitale du HSV2 (OR= 5,63 IC95% [2,22 - 14,28] p= 0,000) et du EBV (OR= 3,90, IC95% [1,28-11,84] p= 0,016) augmentaient le risque de survenue d'une ulcération génitale ce qui ne s'est pas vérifié pour le CMV. **Conclusion :** Le EBV doit être pris en compte dans le diagnostic étiologique d'une ulcération génitale.

Mots clés : CMV, EBV, HSV-2, Ulcération génitale, Excrétion génitale.

ABSTRACT

Introduction: Besides herpes simplex virus type 2 (HSV-2), other human herpes viruses including Epstein Barr virus (EBV) and cytomegalovirus (CMV) are also implicated in genital ulcers arisen. However, these viruses are rarely search in current practice. **Objective:** To explore the relationship between genital shedding of herpes virus (HSV-2, CMV, EBV) and genital ulcers arise in HIV-1 and HSV-2 coinfecting women. **Material-Methods:** A nested cohort study in a clinical trial was perform. At each visit, gynecological examination for genital ulcers and a sample of cervicovaginal lavage enriched (CVLe) by cervical swabbling were realized. Amplification (TaqMan) of virus DNA extrated (QIAGEN) to CVLe. **Results:** The median age of 194 participants was 32 years and 30.4% were on antiretroviral treatment. During the follow up, 32.5 % have reported at least one episode of genital ulcer. HSV-2, CMV and EBV were detected in 92% of participants. Genital shedding of HSV-2 (OR = 5.63 IC 95% [2.22 to 14.28] p = 0.000) and EBV (OR = 3.90 IC 95% [1.28 to 11.84] p = 0.016) increased the risk of genital ulcer occurrence that was not confirm for CMV. **Conclusion:** EBV must be consider in the etiological diagnosis of genital ulceration.

Keywords: CMV, EBV, HSV-2, genital ulceration, genital shedding