



BURKINA FASO

Unité - Progrès - Justice



UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU

Unité de Formation et de Recherche

Sciences de la Vie et de la Terre

(UFR-SVT)

Département de Biochimie

Microbiologie

Centre de Recherche Biomoléculaire (CERBA)

Laboratoire de Biologie Moléculaire et de

Génétique (LaBioGene) UFR/SVT

MEMOIRE

Présenté par :

SAGNA Tani,
Maître ès Sciences

Pour l'obtention du:

Diplôme d'Etudes Approfondies en Biotechnologies

Option : Biotechnologie Microbienne et Cellulaire

ECOLE DOCTORALE REGIONALE DU RA-BIOTECH

SUR LE THÈME :

**Diagnostic précoce, par RT/PCR,
du VIH-1 chez les enfants nés des mères séropositives**

Soutenu le 24 /07 / 2009, devant le jury :

Président : Pr. Alfred TRAORE, Professeur Titulaire, Université de Ouagadougou.

Membres : Pr. Jacques SIMPORE, Maître de Conférences, Université de Ouagadougou.

Dr. Virginio PIETRA , Università di Brescia, Italia.

Préface du Président du RA-BIOTECH.

L'école Doctorale régionale de Ouagadougou offre une formation doctorale de biotechnologie dans ses options : Biotechnologie microbienne et cellulaire, Biotechnologie animale et Biotechnologie végétale. Elle regroupe la plupart des Universités de l'Afrique francophone sub-saharienne en un réseau : le Réseau Ouest Africain de Biotechnologie (RA-BIOTECH) fruit de la coopération inter-universitaire et dont le siège est au CRSBAN, à l'Université de Ouagadougou.

Les Universités et structures de formation des pays ci-dessous constituent les membres fondateurs de ce réseau : Bénin, Burkina Faso, Côte d'Ivoire, Guinée-Conakry, Mali, Niger, Togo et d'autres partenaires comme le Centre International de Recherche Développement sur l'Élevage en zone Sub-humide (CIRDES)-Bobo Dioulasso; l'École Inter Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires (EISMV)-Sénégal.

Ce réseau sous régional bénéficie de l'appui de plusieurs partenaires de l'enseignement supérieur (Association des Universités Africaines)-AUA, UNESCO, Banque Mondiale, CAMES, Agence Universitaire de la Francophonie -AUF, Agence Africaine de Biotechnologie -AAB, etc.

L'école Doctorale que le réseau anime assure une formation de haut niveau à travers une recherche utilitaire sur plusieurs thématiques touchant la vie quotidienne des populations africaines. Cette école a permis au CRSBAN d'être érigé en pôle régional d'excellence en Biotechnologie d'une part par l'AUA et d'autre part par l'AUF. Elle accueille des étudiants de plus de 14 pays d'Afrique Centrale et de l'Ouest.

Le réseau bénéficie aussi du soutien de certains spécialistes des biotechnologies des universités du Nord : Université de la méditerranée (France), Université Louis Pasteur de Strasbourg (France), Centre de Génétique Moléculaire de Gif-sur-Yvette-CNRS (Paris France), Université de Liège (Belgique), Faculté Universitaire de Gembloux (Belgique), Université de Rome, Université Agronomique de Wageningen.

L'importance des biotechnologies dans la résolution des problèmes de développement socioéconomique des pays de l'Afrique sub-saharienne (Alimentation, Santé, Environnement, etc.) Justifie amplement la mise en place de cette formation. Elle est cogérée par un comité pédagogique international africain, constitué par des enseignants, des chercheurs, tous spécialistes dans les divers domaines des biotechnologies.

La mutualisation des expériences par toutes ces compétences est un atout majeur pour la formation des ressources humaines de qualité au profit du continent africain et de l'humanité.

Pr. Alfred S. TRAORE

*Professeur titulaire de Biochimie Microbiologie
Chevalier de l'ordre du mérite
Officier de l'ordre des palmes académiques / CAMES
Directeur pédagogique du CRSBAN*

DÉDICACE

À mon père SAGNA Amadou,

À ma chère mère SAGNA/GUITANGA Francine,

À mes frères et soeurs : Yempabou, Yemboado, Adjima, Wilfried, Farida,

À toutes les mères qui se battent pour éviter la transmission verticale du VIH à leurs progénitures.



REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Biologie moléculaire de Saint Camille et au Centre de Recherche Biomoléculaire Pietro ANNIGONI (CERBA/LABIOGENE). Nous exprimons nos profondes gratitudees :

Au Professeur Alfred S. TRAORE, Président du RA-BIOTECH, pour nous avoir accepté dans le centre de formation doctorale du RA-BIOTECH et pour avoir accepté d'être le Président du Jury pour évaluer notre mémoire de DEA.

Au Professeur Jacques SIMPORE, notre Directeur de mémoire pour avoir guidé nos premiers pas dans la recherche. Il nous a reçu dans son laboratoire bien équipé et nous a aidé dans le choix d'un thème pertinent. Nous avons bénéficié de son encadrement scientifique et de son soutien moral et matériel.

Au Docteur Virginio PIETRA du CMSCO, pour avoir accepté d'être membre du Jury pour évaluer notre mémoire de DEA et également pour vos conseils et votre collaboration.

Au Docteur Salvatore PIGNATELLI, pour avoir accepté que le CMSCO soit un cadre de notre étude.

Au Docteur Christelle NADEMBEGA, pour ses conseils et son soutien durant l'étude.

À Mr Cyrille BISSEYE (Labiogene/ CERBA) pour l'acquisition des techniques de biologie moléculaire.

À toute l'équipe du Laboratoire Saint Camille et du Centre de Recherche Biomoléculaire CERBA/LABIOGENE et en particulier à Mlle Djeneba OUERMI, Mr Robert BAKAMBA, Mr Emmanuel BOUDA, Mr Barthélemy NANA , Mme Justine YARA, Mme Angèle SANFO pour leur assistance technique.

À la Conférence Episcopale Italienne (CEI), pour leur soutien financier dans la réalisation de nos travaux de mémoire de DEA.

À nos oncles et tantes, cousins et cousines, pour leurs encouragements.

À tous ceux qui nous ont soutenu dans nos études scolaires et/ou universitaires.

À tous nos promotionnaires et amis, ce fut un plaisir pour moi de partager ce trajet avec vous.

SOMMAIRE

<i>DÉDICACE</i>	iii
<i>REMERCIEMENTS</i>	iv
SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	ix
RÉSUMÉ.....	x
ABSTRACT.....	xi
INTRODUCTION ET ÉNONCÉ DU PROBLÈME	1
CHAPITRE I – GÉNÉRALITÉS	6
I – 1. DIVERSITÉ DES VIH	7
I – 2. STRUCTURE DU VIH	8
I – 3. RÔLE DES PRINCIPALES COMPOSANTES DU VIH.....	9
I – 4. CELLULES CIBLES DU VIH.....	10
I – 5. MECANISME D’INFECTION PAR LE VIH: CAS DES LYMPHOCYTES T CD4	11
I – 6. RÉPONSE IMMUNITAIRE DE L’HÔTE FACE À L’INFECTION À VIH	12
I – 7. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC DES INFECTIONS À VIH.....	13
I – 7.1. Diagnostic sérologique.....	13
I – 7.2. Diagnostic moléculaire.....	14
I – 8. MÉCANISMES DE TRANSMISSION DU VIH.....	21
I – 9. TRAITEMENTS	21
I – 10. PREVENTION DE LA TRANSMISSION DU VIH DE LA MERE À L’ENFANT	24
CHAPITRE II – MATÉRIEL ET MÉTHODES	26
II – 1. CADRE D’ÉTUDE	27
II – 2. PATIENTS	27
II– 3. NUMÉRATION DES LYMPHOCYTES T CD4 ET DÉTERMINATION DE LA CHARGE VIRALE PLASMATIQUE.....	28
II – 4. DIAGNOSTIC DU VIH-1 PAR LE TEST RT/PCR	39
II – 5. COMITE D’ÉTHIQUE	32
II – 6. ANALYSES STATISTIQUES.....	32
CHAPITRE III – RÉSULTATS ET DISCUSSION	33

III –1. RÉSULTATS	34
III –1.1. Protocole de prévention de la transmission verticale du VIH-1 appliqué aux mères de l'étude.....	34
III –1.2. Paramètres des mères.....	35
III –1.3. Evaluation de la charge virale et du taux de lymphocytes T CD4 des mères en fonction du traitement.....	38
III –1.4. Transmission mère-enfant du VIH-1	40
III –2. DISCUSSION	44
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	50
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	53

SIGLES ET ABRÉVIATIONS

3TC	:	Lamivudine
Ac	:	Anticorps
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
ADNc	:	ADN complémentaire
Ag	:	Antigène
APP	:	Ancien Protocole Prophylactique
ARN	:	Acide ribonucléique
ARV	:	Antirétroviraux
AZT	:	Azidothymidine (Zidovudine)
CD4	:	Classe de Différenciation
CERBA-LaBioGene:		Centre de Recherche Biomoléculaire Pietro Annigoni- Laboratoire de Biologie Moléculaire et de Génétique
CMSCO :		Centre Médical Saint Camille de Ouagadougou
CRSBAN :		Centre de Recherche en Sciences Biologiques, Alimentaires et Nutritionnelles
ELISA :		Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
Env :		Enveloppe
Gag :		Groupe antigène
Gp :		Glycoprotéines
HAART :		Highly Active Antiretroviral Treatment
IgG :		Immunoglobulines
L T CD4 :		Lymphocytes T CD4
LTR :		Long Terminal Repeat
NPP :		Nouveau Protocole Prophylactique
NVP :		Névirapine
PTME :		Prévention de la Transmission Mère-Enfant
RT/PCR :		Reverse Transcriptase/Polymerase Chain Reaction
VIH/SIDA:		Virus de l'ImmunoDéficiency Humaine/ Syndrôme de l'ImmunoDéficiency Acquise

RÉSUMÉ

La plupart des infections à VIH chez les enfants de moins de dix (10) ans sont dues à la transmission mère-enfant. Ces infections peuvent se faire, en absence de prévention, pendant la grossesse (5 à 10% de transmission), pendant l'accouchement (10 à 20%) ou au moment de l'allaitement maternel (5 à 20%). Au Burkina Faso, c'est en 2002 qu'il a été initié au Centre Médical saint Camille, le service de Prévention de la Transmission Mère-Enfant (PTME) du VIH. Le protocole de la PTME préconise: un test de dépistage volontaire du VIH pour les femmes enceintes; la prévention de la transmission verticale par les antirétroviraux (ARV); l'allaitement artificiel ou au sein avec sevrage précoce au troisième mois et un test de dépistage du VIH par la RT/PCR pour les enfants après la naissance ou après sevrage selon l'option d'alimentation.

La technique de RT/PCR nous a permis de détecter 16 enfants positifs au VIH-1 sur un total de 281. L'étude des paramètres des mères dont les enfants ont été inclus dans cette étude nous a permis de trouver qu'il y a eu un risque résiduel de transmission de 9,09% (12/132) chez les mères ayant reçu la monoprofylaxie à la Névirapine; 4,55% (4/88) chez celles sous triprofylaxie AZT +3TC+NVP et 0,00% (0/61) chez celles sous trithérapie HAART.

Le diagnostic précoce du VIH-1 chez les nourrissons favorise leur accès immédiat au traitement avec les ARV. Du fait de la présence des anticorps maternels chez l'enfant jusqu'à l'âge de 14 à 18 mois, les tests sérologiques de routine comme l'ELISA ou le Western blot ne sont pas indiqués. L'utilisation d'une technique de dépistage précoce du VIH-1 chez les enfants nés de mères séropositives, comme celle de la RT/PCR serait nécessaire et recommandable dans le cadre de la PTME au Burkina Faso.

Mots clés : VIH – Nouveau né - RT/PCR – PTME – femmes enceintes

ABSTRACT

Most of HIV infections in children less than ten (10) years of age are due to mother-to-child transmission. These infections occur, in absence of prevention, during the pregnancy (5 to 10% transmission rate), during childbirth (10 to 20%) or at the time of breast-feeding (5 to 20%). At the Saint Camille Medical Center (Burkina Faso), the Prevention of Mother-to-Child Transmission (PMTCT) of HIV service was introduced in 2002. The PMTCT protocol recommends: voluntary testing for pregnant women; prevention of vertical transmission by use of antiretrovirals (ARV); artificial-feeding or pre-terminatum breastfeeding after the third month, as well as an HIV test by RT/ PCR for children after their birth or after weaning according to food option.

Using RT/PCR test, we detected HIV-1 in 16 children from a total of 281. Using information obtained from the mothers whose children were enrolled in this study, we found that there was a residual transmission risk of 9,09% (12/132) among the mothers having received monophylaxie for Nevirapine; it was 4,55% (4/88) with triphylaxie AZT+3TC+NVP and 0,00% (0/61) with those under combination with HAART.

Early diagnosis of the HIV in infants promotes their immediate access to treatment with ARV. Due to the presence of the maternal antibodies in child until the age of 14 to 18 months, routine serological analyses such as ELISA or Western blot are not applicable. Thus, evaluation of early diagnosis of HIV among newborns of infected mothers, as RT/PCR would be necessary and advisable in the context of PMTCT in Burkina Faso. The use of an early technique of tracking of the VIH-1 in the children born HIV positive mothers, as that of the RT/PCR would be necessary and advisable within the framework of the PTME to Burkina Faso.

Keywords: HIV - New born - RT/PCR - PMTCT - pregnant women

INTRODUCTION ET ÉNONCÉ DU PROBLÈME

INTRODUCTION

L'épidémie d'infection à VIH/SIDA (Virus de l'ImmunoDéfiance Humaine/ Syndrome de l'ImmunoDéfiance Acquise) est observée partout dans le monde. En 2007 on estimait à 33,2 millions [30,6 - 36,1millions] le nombre de personnes vivants avec le VIH (UNAIDS, 2008) ; les femmes représentant 15,4 millions [13,9 – 16,6millions] et les enfants de moins de 15 ans 2,5 millions [2,2 – 2,6millions]. Le nombre annuel de nouvelles infections à VIH a baissé ; passant de 3,0 millions [2,6 - 3,5millions] en 2001 à 2,7 millions [2,2millions-3,2millions] en 2007.

En Afrique, la situation est particulièrement préoccupante car le sida reste la première cause de décès des adultes (ONUSIDA/OMS, 2007).

L'Afrique subsaharienne est la région du monde la plus touchée par cette épidémie avec environ 22,5millions [20,9 – 24,3millions] de personnes vivant avec le VIH, soit 68% du total mondial.

Parmi les nouvelles tendances significatives, il faut noter la baisse récente de la prévalence nationale du VIH au Burkina Faso. En effet, selon les estimations de l'OMS, le nombre de personnes, adultes et enfants, vivant avec le VIH/SIDA est passé de 140.000 [120.000 – 160.000] en 2001 à 130.000 [110.000 – 160.000] en 2007. La prévalence du VIH chez les adultes a été estimée à 1,6% [1,4 - 1,9] en 2007 (UNAIDS, 2008). La prévalence du VIH parmi les jeunes femmes enceintes (15 – 24ans) fréquentant les services de soins prénataux urbains est passée de près de 4% en 2001 à un peu moins de 2% (OMS, 2006).

Le VIH se transmet essentiellement par voie sexuelle, par voie sanguine et par voie verticale de la mère à l'enfant.

La transmission verticale est à l'origine de la majorité des infections à VIH chez les enfants de moins de dix (10) ans (OMS, 2002). Il existe trois (03) étapes possibles de transmission mère-enfant: elle peut se faire, en absence de prévention, in utero pendant la grossesse (cinq à 10% des cas), pendant l'accouchement (dix à 20% de cas) ; ou au moment de l'allaitement (cinq à 20%) (OMS, 2002 ; 2005).

Le Burkina Faso à l'instar d'autres pays africains a élaboré une stratégie nationale multisectorielle de lutte contre le VIH/SIDA et les IST de 2001 à 2005 (CNLS-IST, 2009). La stratégie inclue un programme national de Prévention de la Transmission Mère-Enfant du VIH (PTME) par chimioprophylaxie à la Névirapine et allaitement artificiel ou limité aux trois (03) premiers mois (OMS, 2004a). Ce programme devait contribuer à réduire la propagation du VIH au sein de la population, plus spécifiquement en réduisant celle de la transmission du VIH de la mère à l'enfant.

Un nouveau programme couvrant la période 2006-2010 (DSF Burkina, 2006) vise d'une part à combler les insuffisances constatées lors de la mise en oeuvre du premier programme et d'autre part à introduire des protocoles ARV plus efficaces. L'option prise dans ce deuxième programme est une prophylaxie à partir de la 28^{ème} semaine de grossesse pour les femmes non éligibles au traitement ARV et la trithérapie pour celles qui sont éligibles (Annexe III).

Le risque lié à l'allaitement maternel peut être réduit à moins de 2% en cas de traitement antirétroviral préventif administré à la mère et dans les premières semaines de vie du nouveau-né (OMS, 2007). Bien qu'il n'y ait pas de différence significative entre le taux de mortalité parmi les enfants nourris au lait maternel (1,9%) et parmi les enfants nourris artificiellement (2,1%) (SIMPORE *and al.*, 2006), il est toujours important de noter que jusqu'à 20% des nourrissons nés de mères infectées par le VIH peuvent contracter l'infection par le lait maternel (OMS, 2002).

Pour une prise en charge effective, un diagnostic précoce du VIH chez les enfants nés de mères séropositives s'avère alors nécessaire. Chez ces enfants, les anticorps d'origine maternelle sont décelables jusqu'à l'âge de 15-18 mois, empêchant toute démarche diagnostique sérologique car pouvant donner des résultats faussement positifs. L'utilisation d'une méthode de diagnostic moléculaire est indiquée à cet effet (COUTLEE *and al.*, 1994 ; TARNAGDA *and al.*, 2003).

ÉNONCÉ DU PROBLÈME

Malgré les programmes de prévention de la transmission mère-enfant du VIH, il existe des risques de transmission résiduels du VIH chez l'enfant né de mère séropositive.

JUSTIFICATIF DE L'ÉTUDE

Cette étude permettra de déterminer le taux de transmission résiduel malgré les méthodes de prévention de la transmission du VIH-1 de la mère à l'enfant au Burkina Faso et par conséquent de tester leur efficacité.

OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

➤ OBJECTIF PRINCIPAL :

L'objectif principal de cette étude est de diagnostiquer précocement, par RT/PCR, l'infection à VIH-1 chez les enfants nés des mères séropositives.

➤ OBJECTIFS SPÉCIFIQUES :

Les objectifs spécifiques visés sont de dépister les femmes enceintes par la technique sérologique ELISA; promouvoir l'utilisation du diagnostic précoce du VIH-1 par RT/PCR au Burkina Faso; estimer la corrélation entre virémie et taux des lymphocytes CD4 maternels avec la transmission mère enfant du VIH-1; déterminer le taux résiduel de transmission du VIH-1 chez les enfants nés de mères séropositives.

CHAPITRE I- GÉNÉRALITÉS

I- 1. DIVERSITÉ DES VIH

Deux types de virus sont responsables de l'infection à VIH/SIDA : le VIH-1 qui est répandu dans le monde entier et le VIH-2 qui est essentiellement localisé en Afrique. Il existe des cas de co-infection à VIH-1 et VIH-2 limité à l'Afrique subsaharienne.

Pour une prise en charge spécifique, un diagnostic de différenciation entre les deux types de virus est indispensable.

Le VIH-1 est divisé en 3 groupes: M (Majeur), N (New) et O (Outlier). Le groupe M est responsable de la pandémie actuelle, les autres groupes étant rares. Le groupe Majeur est subdivisé en sous-types (A, B, C, D, F, G, H, J, K) et souches recombinantes (ROQUEBERT *and al.*, 2009). Le sous-type B est le plus répandu en Occident. On le retrouve majoritairement chez les homosexuels et les toxicomanes. En Afrique centrale, tous les sous-types sont représentés. Le sous-type A et la forme recombinante entre les sous-types A et G, dite CRF02, sont responsables d'un grand nombre d'infections en Afrique de l'Ouest. Les sous-types C et D sont majoritaires en Afrique de l'Est et en Afrique du Sud. Les virus du groupe O, peu fréquents, sont trouvés presque exclusivement en Afrique centrale (Cameroun, Gabon, Guinée-équatoriale) (PLANTIER *and al.*, 2002; GUEUDIN, 2003).

Pour le VIH-2, plusieurs sous-types ont été décrits. Seuls les sous-types A (Cap-Vert, Guinée-Bissau, Guinée, Sénégal) et les sous-types B (Côte-d'Ivoire, Mali et Burkina-Faso) ont une diffusion épidémique.

I- 2. STRUCTURE DU VIH

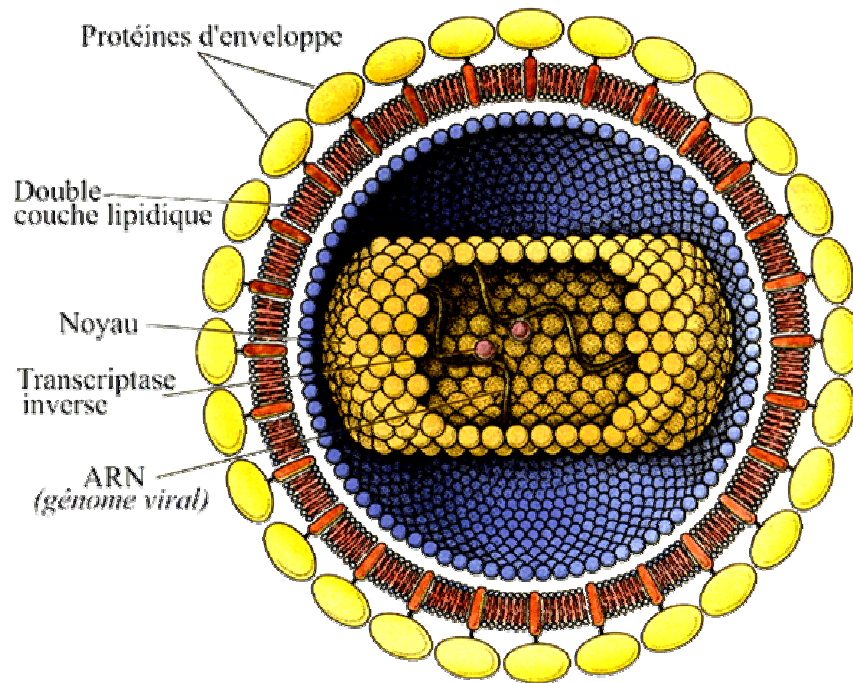


Figure 1 : Structure du VIH

Source:

<http://www.museumgrenoble.fr/passe/sciencefete/1/media/structureHIV.gif>

Le VIH responsable du Syndrome d'Immunodéficience Acquise (SIDA), est un rétrovirus de 0,1 μ m de diamètre appartenant à la sous-famille des *Lentiviridae*. Il contient dans sa capsidie des enzymes -la transcriptase inverse, l'intégrase, la protéase et la ribonucléase- ainsi que deux (02) molécules d'ARN identiques (*enveloppées par la nucléocapside*).

Le VIH est structuré de l'extérieur à l'intérieur comme suit (figure 1):

- Une enveloppe constituée de glycoprotéines gp120, gp41 et d'une double couche de phospholipides;

- Une matrice formée de glycoprotéines gp17;
- Une capsidie constituée de glycoprotéines gp24.

Le virus possède trois gènes codants pour les différentes protéines virales: Gag (groupe antigène) qui code pour des protéines de la capsidie, Pol (polymérase) qui code pour des enzymes nécessaires à sa réplication, Env (enveloppe) qui code pour des glycoprotéines. Les gènes *gag*, *pol*, *env* sont régulés par des séquences terminales répétitives Long Terminal Repeat (LTR) qui sont créées lorsque la transcriptase reverse synthétise l'ADN proviral.

I- 3. RÔLE DES PRINCIPALES COMPOSANTES DU VIH

➤ La capsidie

Dans la capsidie se trouvent deux (02) brins d'ARN identiques qui sont le matériel génétique du virus. Elle est protéique et joue le rôle d'enveloppe protectrice.

➤ La transcriptase inverse

Elle convertit un ARN viral simple brin en ADN double brin complémentaire (ADNc) qui s'intégrera ensuite facilement à l'ADN de la cellule hôte sous forme d'ADN proviral.

➤ L'Intégrase

Elle permet l'intégration de l'ADNc à l'ADN chromosomique de la cellule hôte.

➤ La Protéase

Elle permet la séparation des protéines générées qui pourront alors être assemblées et utilisées pour la formation de nouveaux virions (particules virales).

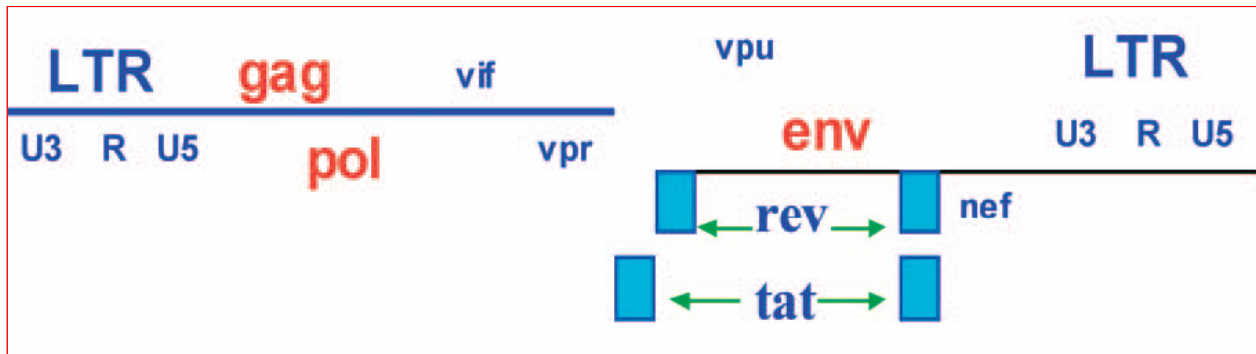


Figure 2 : Disposition des gènes du VIH

I- 4. CELLULES CIBLES DU VIH

Les cellules infectées par le VIH doivent exprimer à leur surface le récepteur CD4. En effet, le récepteur CD4 présente une haute affinité pour la molécule gp120. Lorsque le virus du SIDA s'attaque à une cellule cible, il se lie à celle-ci grâce à sa glycoprotéine de surface gp120, au niveau d'une porte d'entrée composée du récepteur CD4 ainsi que des co-récepteurs appartenant à la famille des récepteurs de chimiokines, dont les principaux sont le CXCR4 et le CCR5 (REVILLARD *and al.*, 2001; KIM *and al.*, 2009).

Les lymphocytes T CD4 sont les principales cibles du virus (THEZE, 2008). Leur nombre diminue au fur et à mesure que l'infection par le VIH progresse. La réduction et la détérioration des lymphocytes T CD4 entraînent une immunodéficiences profonde; leur taux sert à indiquer la gravité de l'infection (FRIPPIAT *and al.*, 1999 ; HU *and al.*, 2001).

Outre les lymphocytes T CD4, les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques qui expriment ce récepteur CD4 sont aussi des cellules cibles du virus du

SIDA (MORROW *and al.*, 2007). Les macrophages jouent un rôle de cellules réservoirs en phagocytant les cellules infectées.

I- 5. MECANISME D'INFECTION PAR LE VIH: CAS DES LYMPHOCYTES T CD4

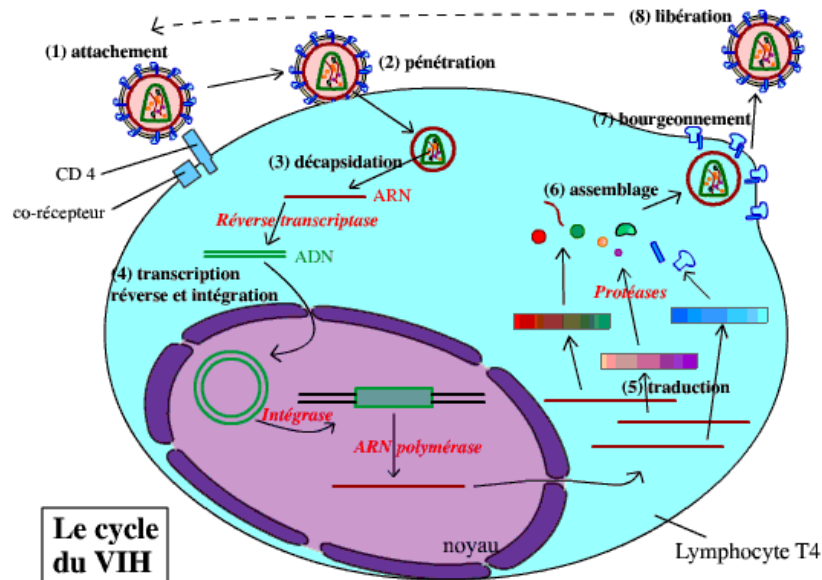


Figure 3 : Mécanisme d'infection par le VIH

Source : <http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/SIDA/image/cycle.sws>

Légende

(1) attachement

Le virus se fixe sur le lymphocyte T CD4, par reconnaissance entre la protéine virale gp120 et la protéine CD4 du lymphocyte (ainsi qu'un co-récepteur).

(2) pénétration

Les deux membranes (du virus et du lymphocyte) fusionnent, ce qui permet la pénétration de la nucléocapside (les deux capsides + le matériel génétique, etc.) du virus dans le cytoplasme.

(3) décapsulation

Les deux capsides se dissocient, libérant l'ARN viral dans le cytoplasme.

(4) reverse transcription et intégration

Grâce à la reverse transcriptase virale, l'ARN viral est rétrotranscrit en ADN proviral. Cet ADN pénètre dans le noyau, où il s'intègre au génome du lymphocyte. Il est ensuite transcrit en ARN.

(5) traduction

Après avoir été transcrits par l'ARN polymérase de la cellule, les ARN messagers viraux sont traduits en trois précurseurs protéiques. Ces précurseurs sont clivés par des protéases, pour donner les différentes protéines virales.

(6) assemblage

Les protéines virales et l'ARN viral sont associées pour former de nouvelles particules virales infectieuses. Les protéines virales membranaires sont intégrées à la membrane du lymphocyte.

(7) bourgeonnement

Le virus bourgeonne, emportant un fragment de la membrane plasmique du lymphocyte sur laquelle sont intégrés les protéines membranaires virales.

(8) libération

Les nouveaux virus sont libérés dans le milieu intérieur. Ils peuvent infecter de nouveaux lymphocytes T CD4.

I- 6. RÉPONSE IMMUNITAIRE DE L'HÔTE FACE À L'INFECTION À

VIH

Après la contamination, le virus est détectable sous la forme d'acide nucléique (ARN) dès le 10 - 12ème jour et sous sa forme d'antigène p 24, vers le 12 - 14ème jour (PLANTIER *and al.*, 2002). Les premiers anticorps sont détectables vers le 21ème jour (séroconversion).

La réponse immunitaire induite par l'infection à VIH peut contrôler transitoirement l'infection chez certains sujets, au moins pendant un certain temps. Il s'agit de:

- **L'immunité non spécifique** : ce sont des barrières naturelles à l'infection comme la phagocytose par les neutrophiles et les macrophages.
- **L'immunité spécifique** : il s'agit de l'immunité cellulaire assurée par les lymphocytes T ; et de l'immunité humorale assurée par les lymphocytes B.

La réponse cellulaire se traduit par l'apparition de lymphocytes T-cytotoxiques (CD8) qui reconnaissent les cellules infectées (en particulier les lymphocytes T CD4) et les détruisent avant que celles-ci n'aient fabriqué de nouvelles particules virales. Mais comme les lymphocytes T CD4 sont indispensables à l'activation des T-cytotoxiques, leur destruction affaiblit progressivement l'efficacité de la réponse immunitaire.

La réponse humorale se traduit par l'apparition d'anticorps anti-VIH qui empêchent la fixation des particules virales aux cellules cibles.

L'infection à VIH détermine à terme une immunodépression définissant le sida, le sida étant une dépression du système immunitaire rendant l'hôte vulnérable à de multiples infections opportunistes.

I-7. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC DES INFECTIONS À VIH

Le diagnostic des infections à VIH repose chez l'adulte sur la détection des anticorps. Seul le diagnostic précoce dans les premiers mois de vie chez l'enfant né de mère séropositive nécessite la mise en évidence du virus, de ses composants ou de son génome.

I-7.1. Diagnostic sérologique

Le dépistage des anticorps anti-VIH s'effectue le plus souvent par des tests ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) en utilisant un spectrophotomètre lecteur de microplaques ou par des tests rapides à lecture de bandes visuelles. Ces tests sont capables de dépister à partir d'un sérum ou d'un plasma humain, les anticorps anti-VIH1 et anti-VIH2 (MAIGA *and al.*, 1992).

Deux types de tests ELISA sont utilisés pour le dépistage :

- Le test ELISA “Sandwich” où la révélation de la réaction entre Ag du kit et Ac anti-VIH du patient se fait par un Ag marqué se fixant sur les sites Ac restés libres.
- Le test ELISA “indirect” où la fixation des Ac du patient sur les Ac du kit est révélée par une anti-globuline humaine anti IgG marquée par une enzyme.

Une autre technique, le Western Blot (WB) est une méthode utilisée comme test de confirmation de référence (PLANTIER *and al.*, 2002; KLIMKAIT *and al.*, 2008). Le WB est une technique de transfert sur nitrocellulose, après migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide, de protéines d'un lysat viral VIH-1 ou VIH-2. Sur la bandelette de WB, différentes protéines constitutives des virus seront reconnues par des anticorps spécifiques anti-VIH-1 ou VIH-2. Le recours au WB pour une confirmation de sérologie VIH positive n'est pas vulgarisé dans tous les laboratoires en Afrique à cause de sa complexité technologique.

I– 7.2. Diagnostic moléculaire

➤ La RT/PCR quantitative : la charge virale

La charge virale désigne la quantification de l'ARN plasmatique du VIH, réalisée par PCR temps réel. Celle-ci est exprimée en nombre de copies/ml et en log (base 10). C'est le \log_{10} du nombre de copies/ml qui est utilisé pour évaluer la variation dans le temps de la charge virale. Une variation supérieure ou égale à 0,5 est significative.

La charge virale est définie en mesurant la concentration de l'ARN virale dans le sang.

La quantification de l'ARN plasmatique du VIH est, avec la quantification des lymphocytes T CD4, les principaux examens du suivi biologique de l'évolution de l'infection à VIH chez un patient (HU *and al.*, 2001; SCHNEIDER, 2003); ils permettent de déterminer le moment où il devient nécessaire de débiter un traitement antirétroviral et de suivre son efficacité et sa tolérance (CHAPLAIN *and al.*, 2006 ; BELAN *and al.*, 2008). La charge virale, indique le nombre de virions dans l'organisme (DEHEE, 2003), par voie de conséquence la vitesse de réplication du VIH dans l'organisme.

Par ailleurs, dans la progression normale de l'infection à VIH constatée chez la plupart des patients, la charge virale augmente dès la contamination avant de régresser. Une charge virale est généralement détectable au bout des 15 premiers jours suivant la contamination. Ce test peut rentrer dans le cadre du diagnostic et peut être pratiqué dans certains cas pour une détection précoce d'une séropositivité. Si une valeur positive est significative, une charge virale indétectable n'est absolument pas significative.

La différence entre deux mesures de charge virale espacées dans le temps permet d'évaluer la vitesse de réplication du VIH et par voie de conséquence la progression de l'infection (HU *and al.*, 2001). Il y a un lien direct entre la charge virale et le niveau du déficit immunitaire, occasionné principalement par la disparition des lymphocytes T CD4 (FRIPPIAT *and al.*, 1999). Malheureusement, la RT/PCR quantitative a ses limites : de nombreux réactifs pour la charge virale ont une limite de détection située entre 50 à 30 copies de particules virales par millilitre. Cela signifie qu'une charge virale inférieure à 20 copies par millilitres donne un résultat : indétectable. Il faudra alors utiliser une RT/PCR qualitative pour le diagnostic précoce du VIH dans le cadre de la transmission mère enfant du VIH.

➤ **La RT/PCR qualitative**

La transcription inverse est un processus dans lequel l'ARN monocaténaire est transcrit en ADN complémentaire (ADNc). Le couplage de la PCR à une étape de transcription inverse constitue la RT/PCR. La RT/PCR est une technique qualitative adaptée à l'étude directe des génomes viraux et des ARNm présents dans le plasma (REYNIER *and al.*, 1996; ASSAL *and al.*, 2003). Une autre technique, la PCR/ADN/VIH, permet la détection de l'ADN proviral intégré au génome cellulaire.

Pour les virus à ARN comme le VIH, les échantillons d'ARN sont utilisés pour fabriquer un ADNc qui servira ensuite de matrice pour la PCR. Les ADNc monocaténaires sont alors répliqués par l'ADN polymérase au cours d'un premier cycle de température. D'autres cycles sont réitérés afin d'amplifier les ADNc bicaténaires en grande quantité.

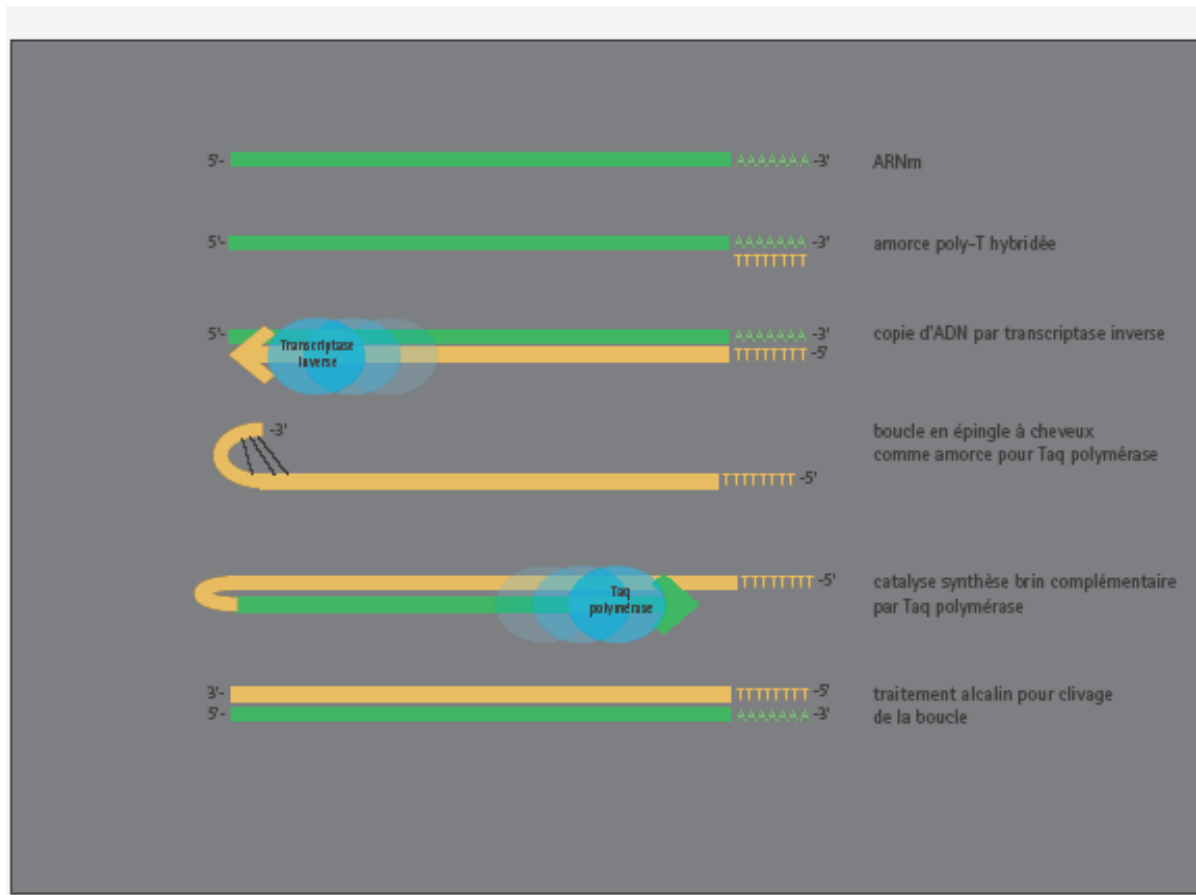


Figure 4 : Principe de la RT/PCR

Source : [http:// :www.ecole-adn.fr](http://www.ecole-adn.fr)

Légende:

L'amorce poly-T se fixe en 3' de l'ARNm poly-A.

La transcriptase inverse synthétise l'ADNc à l'ARNm à partir de l'amorce et forme une boucle en forme d'épingles à cheveux à son extrémité 3'.

La boucle sert d'amorce pour la Taq polymérase qui synthétise alors un brin complémentaire qui s'oriente de 5' vers 3'.

-La transcription inverse

Cette réaction est catalysée par la Transcriptase Inverse (TI) qui synthétise une chaîne d'ADN à partir d'une matrice d'ARN. La réaction emploie de l'ARN, une enzyme (transcriptase inverse ou reverse transcriptase), une amorce, des dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP,) et un inhibiteur de RNase.

La TI parcourt l'ARN viral et le transcrit en une première molécule d'ADN simple-brin, ou ADN brin (-). Pendant cette synthèse, l'ARN matrice est dégradé par une activité dite "RNase H" portée par la TI. La dégradation de l'ARN est totale, sauf pour deux courtes séquences. Ces deux courtes séquences vont servir d'amorces à la TI pour la synthèse du second brin d'ADN, le brin (+), en utilisant l'ADN brin (-) comme matrice. L'ADN final est une molécule bicaténaire aussi appelée ADN double-brin. Une particularité de la transcriptase inverse est de ne pas être fidèle dans sa transcription et de souvent faire des erreurs. C'est la raison pour laquelle le VIH a une très grande variabilité génétique.

-La réaction de PCR

La Réaction de Polymérisation en Chaîne ou PCR pour « Polymerase Chain Reaction » a été mise au point vers les années 1980 par Kary Mullis (WATSON *and al.*, 1994).

C'est une technique permettant d'amplifier une séquence recherchée. Son principe repose sur l'utilisation de l'ADN polymérase, il s'agit d'une répllication *in vitro* de séquences spécifiques d'ADN. Le matériel de départ est de l'ADN bicaténaire qui contient la séquence à amplifier.

Le cycle de PCR suivant a été décrit par WATSON et collaborateurs (1994) :

À la première étape deux amorces oligonucléotidiques, l'ADN polymérase et un mélange des quatre nucléotides précurseurs sont ajoutés au tube contenant l'ADN, le volume total de la réaction est en général 100µl.

La deuxième étape consiste en un chauffage à 94°C pendant 5mn entraînant la dénaturation des molécules d'ADN. Les simples brins obtenus servent de matrice à l'ADN polymérase. Le refroidissement (60°C environ) permet aux amorces de s'associer à leurs séquences complémentaires qui encadrent la région à amplifier. À la fin de cette étape, on obtient des matrices d'ADN simples brins avec lesquelles sont hybridées les amorces pour l'ADN polymérase.

Dans la troisième étape, on élève la température jusqu'à 72°C, qui est la température optimale pour le fonctionnement de la Taq polymérase. Il s'agit d'une enzyme issue de la bactérie *Thermus aquaticus*. Celle-ci synthétise de nouveaux brins d'ADN complémentaires à la matrice à partir de l'amorce pendant 5mn.

A la fin de ces trois étapes, la température est de nouveau portée à 94°C pendant 20 secondes de façon à ce que les courtes régions d'ADN doubles brins constitués d'un brin initial et d'un brin néoformé se séparent.

Le cycle de dénaturation, d'hybridation des amorces et de synthèse par l'ADN polymérase est répété dans le même tube de 30 à 60 fois.

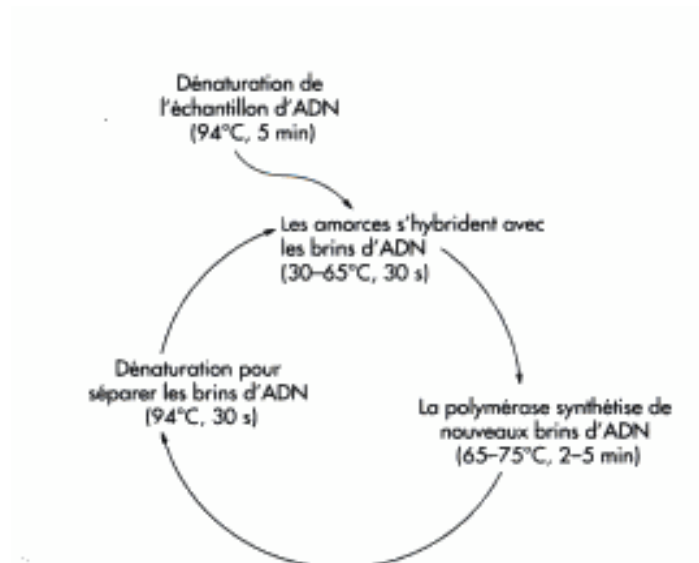


Figure 5 : Un cycle de PCR

Source : WATSON and al., 1994 (ADN recombinant, éditions De Boeck).

Légende : L'échantillon d'ADN est chauffé afin de séparer les deux brins d'ADN (première dénaturation). Ensuite, se répète la série Hybridation de l'amorce, Synthèse de l'ADN et Dénaturation. La concentration de la séquence d'intérêt double à chaque cycle.

➤ Autres techniques dérivées

PCR multiplex

Cette technique permet de rechercher les virus de structure proche, en amplifiant une séquence commune aux virus recherchés à l'aide d'amorces. La révélation se fait avec des sondes spécifiques de chacun des virus recherchés.

PCR Temps réel

C'est une technique permettant de suivre, en temps réel, cycle par cycle, la formation des produits amplifiés grâce à des sondes fluorescentes, hybridées et activées simultanément à l'amplification (FREEMAN and al., 1999).

La PCR temps réel est une technique de quantification de sensibilité excellente ; elle permet de déterminer le taux d'ADN ou d'ARN spécifiques dans un échantillon biologique.

I- 8. MÉCANISMES DE TRANSMISSION DU VIH

Le VIH peut se transmettre par voie sexuelle, par voie sanguine ou par voie verticale de la mère à l'enfant.

En ce qui concerne la transmission verticale du VIH de la mère à l'enfant, il existe trois (03) niveaux possibles de contamination (OMS, 2002 ; 2005):

In utero, pendant la grossesse : il s'agit d'une transmission transplacentaire qui peut se faire surtout lors du deuxième ou troisième trimestre. Cinq à 10% des cas en absence de traitement.

Intrapartum : pendant l'accouchement, la transmission, peut se faire à travers les contacts sanguins et/ou sécrétions cervico-vaginales. Dix à 20% de cas.

Postpartum : après l'accouchement, la transmission peut se faire via l'allaitement maternel. Cinq à 20% de cas.

I- 9. TRAITEMENTS

Les antirétroviraux constituent l'arsenal thérapeutique contre le VIH, qui s'étoffe progressivement. Ils ont pour but d'interférer sur différents mécanismes, d'une part sur les enzymes du VIH nécessaires à sa réplication et d'autre part sur ses mécanismes d'entrée dans la cellule. L'objectif du traitement antirétroviral est de réduire au maximum la réplication du virus pour le rendre indétectable dans le plasma (TUBIANA *and al.*, 1997), soit l'obtention d'une charge virale plasmatique inférieure au seuil de détection, en général < 50 copies/mL (LAUNAY, 2008) conduisant ainsi à

une restauration immunitaire par l'augmentation du taux de lymphocytes T CD4 et l'amélioration de leur fonction.

Les antirétroviraux sont classés suivant leur domaine d'action (Yaffe *and al.*, 2004; CHAPLAIN *and al.*, 2006):

➤ **Inhibiteurs de la transcriptase inverse**

Les inhibiteurs de la transcriptase inverse empêchent la synthèse d'ADN proviral à partir de l'ARN viral. On trouve dans cette classe :

- **Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse (INTI)**

Les INTI ont constitué la première classe d'antirétroviraux mis sur le marché en 1985. “Ce sont des prodrogues” devant être phosphorylés pour conduire à des dérivés actifs sur la transcriptase inverse. Ils comprennent la Zidovudine (AZT), la Didanosine (ddI), la Zalcitabine (ddC), la Stavudine (d4T), la Lamivudine (3TC), l'Abacavir (ABC) et l'Emtricitabine (FTC).

- **Inhibiteurs Non Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse (INNTI)**

Les INNTI sont des inhibiteurs puissants et très sélectifs de la transcriptase inverse du VIH. Leur particularité est qu'ils n'ont pas besoin d'être métabolisés pour inhiber la transcriptase inverse du VIH. Ils ne sont pas actifs sur le VIH-2 et le groupe O du VIH-1. On trouve dans cette classe la Nevirapine (NVP) et l'Efavirenz.

- **Analogues nucléotidiques**

Les analogues nucléotidiques comme le Ténofovir qui a été mis sur le marché en 2002, sont des composés de synthèse organophosphorés. Ils s'incorporent sous leur forme triphosphorylée, à la chaîne d'ADN en formation lors de la transcription de l'ARN du virus et en bloquent l'étape finale.

- **Inhibiteurs de la Protéase (IP)**

Les inhibiteurs de la protéase (IP) agissent en inhibant l'action de la protéase virale qui permet le découpage et l'assemblage des protéines virales, processus indispensable à l'obtention de virus infectieux. On obtient alors des virions incapables d'infecter de nouvelles cellules. Les IP sont actifs sur le VIH-1 et le VIH-2. Quatre inhibiteurs de la protéase sont actuellement utilisés dans le traitement du VIH : le Saquinavir (Invirase®), le Ritonavir (Norvir®), l'Indinavir (Crixivan®) et le Nelfinavir (Viracept®).

- **Inhibiteurs d'intégrase**

Ces inhibiteurs bloquent l'action de l'intégrase et empêchent ainsi le génome viral de se lier à celui de la cellule cible. (Exemples: Raltégravir, Elvitégravir).

- **Inhibiteurs de fusion (IF)**

Les inhibiteurs de fusion interviennent au début du cycle de réplication du VIH en bloquant les protéines de surface du VIH ou perturbant les co-récepteurs des cellules ciblées par le VIH. (Exemple: le T-20 ou Enfuvirtide).

Bien que ces médicaments puissent avoir des effets secondaires passagers ou permanents qui peuvent conduire à l'arrêt ou surtout la modification du traitement, ils ont une efficacité relativement importante lorsqu'ils sont correctement suivis.

Le traitement antirétroviral repose actuellement sur une trithérapie associant généralement 2 inhibiteurs nucléosidiques et 1 inhibiteur non nucléosidique ou 1 inhibiteur de protéase (GARRAIT, 2001).

I- 10. PREVENTION DE LA TRANSMISSION DU VIH DE LA MERE À L'ENFANT

La prévention de la transmission de la mère à l'enfant peut se situer à plusieurs niveaux (OMS, 2002) :

Traitements antirétroviraux : Un certain nombre de traitement antirétroviraux – zidovudine, zidovudine et lamivudine ou nevirapine, ou traitements antirétroviraux combinés– ont permis de réduire la transmission du VIH de la mère à l'enfant (EKPINI *and al.*, 2005).

Accouchements à moindre risque: Les césariennes se sont avérées un moyen efficace de réduction du risque de transmission du VIH de la mère à l'enfant. Cependant, en cas de ressources limitées, cette intervention n'est peut-être pas appropriée car elle est coûteuse et surtout associée à des risques de complications.

Options d'alimentation du nourrisson : L'allaitement au sein peut accroître de dix à 20% le risque de transmission du VIH. Cependant, un enfant qui n'est pas nourri au sein, peut être exposé à un risque accru de malnutrition ou de maladies infectieuses autres que le VIH.

Lorsque l'alimentation de substitution est une solution acceptable, possible, d'un coût abordable, sûre et durable, il est recommandé à toutes les mères infectées de ne pas allaiter leur nourrisson au sein. Dans le cas contraire, l'allaitement exclusif au sein est recommandé pendant les premiers mois de vie ; il devra ensuite être interrompu dès que possible.

CHAPITRE II – MATÉRIEL ET MÉTHODES

II- 1. CADRE D'ÉTUDE

Ouagadougou (BURKINA-FASO):

- Prévention de la Transmission Mère-Enfant du VIH (PTME) du Centre Médical Saint Camille (CMSC) pour la consultation des dossiers médicaux des mères; et la pédiatrie pour la référence des enfants;
- Laboratoire du CMSC comprenant plusieurs sections à savoir la salle de prélèvement; la biochimie; l'hématologie où la détermination du taux des lymphocytes T CD4 a été effectuée; l'immunologie; la parasitologie; la bactériologie;
- Centre de Recherche Biomoléculaire Pietro Annigoni-Laboratoire de Biologie Moléculaire et de Génétique (CERBA-Labiogene) où toutes les étapes du diagnostic par RT/PCR ont été effectuées.

II- 2. PATIENTS

L'étude a porté sur un ensemble de 281 enfants de moins de 18 mois nés de mères VIH séropositives volontaires se présentant aux consultations prénatales et/ou postnatales au CMSC de la ville de Ouagadougou. La sérologie des mères a été confirmée par la méthode ELISA utilisant un appareil spectrophotomètre lecteur de microplaques.

Le sang (6ml) a été prélevé de Janvier 2007 à Avril 2009 au laboratoire du CMSCO sur des tubes imprégnés d'EDTA et le plasma a été collecté après centrifugation à 40 000g pendant 10mn. Des aliquotes de 1,5ml ont été conservés à -50°C.

L'étude a également concerné un examen des dossiers médicaux des mères des enfants afin de rechercher les traitements ARV administrés et éventuellement leur charge virale; le sang a également été prélevé chez les mères afin de déterminer leur taux de lymphocytes T CD4 au moment du dépistage du VIH-1 par la technique de la RT/PCR chez leurs enfants. L'analyse de ces dossiers a permis d'évaluer l'effet de ces données sur la transmission mère-enfant du VIH-1.

➤ **Critères d'inclusion**

- ✓ Mères incluses dans le programme de PTME ou référées au Centre Médical Saint Camille avant ou après l'accouchement.
- ✓ Enfants dont les mères sont infectées par le VIH-1 ou ont une co-infection de VIH-1/VIH-2.
- ✓ Mères consentantes à l'étude.

➤ **Critères d'exclusion**

- ✓ Les enfants dont les mères sont infectées uniquement par le VIH-2.
- ✓ Les enfants âgés de plus de 18 mois.

II- 3. NUMÉRATION DES LYMPHOCYTES T CD4 ET DÉTERMINATION DE LA CHARGE VIRALE PLASMATIQUE

Les lymphocytes T CD4 ont été comptées pour les mères par le FACSCount (Becton Dickinson, San Jose, CA); et la charge virale a été déterminée pour celles dont le taux de lymphocytes T CD4 était inférieur ou égal à 350 cellules par μ l en utilisant un Real Time PCR, un M2000 (ABBOTT).



Figure 6: Real Time PCR M2000 (ABBOTT)

II- 4. DIAGNOSTIC DU VIH-1 PAR LE TEST RT/PCR

Les précautions recommandées pour la RT/PCR ont été prises en compte pour éviter la contamination. Les amplifications se sont effectuées dans un thermocycleur Applied Biosystems Gene Amp® PCR System 9700.



Figure 7: Kit d'extraction de l'ARN
(Analytikjena)



Figure 8: Thermocycleur 9700
(Applied Biosystems)

La retrotranscription a d'abord permis la transcription de l'ARN en ADNc qui sera ensuite amplifié par PCR.

-Extraction de l'ARN viral plasmatique.

L'ARN a été isolé du plasma selon le protocole décrit dans le kit d'extraction Analytikjena, (Annexe I) utilisé à cet effet.

-Retrotranscription

Le Master-Mix utilisé pour la retrotranscription était composé de:

- 1µl de H₂Od-PCR
- 2µl de Taq buffer 10X
- 1µl de DNTP-Mix 110
- 5µl de Primer RT-K
- 0,5µl de MoMuLV-RT26 (Reverse transcriptase)
- 0,5µl de Rnasin 26 (Diatech)
- 10µl d'ARN extrait / 10µl de H₂Od-PCR pour le CN (Contrôle Négatif) / 10µl de cDNA positive control du kit (Diatech) pour le CP (Contrôle Positif).

La retrotranscription a été réalisé dans le thermocycleur dans les conditions suivantes :

- 42°C pendant 25mn
- 94°C pendant 5mn (pour dénaturer la transcriptase inverse)

-Amplification

Le Master-Mix utilisé pour l'amplification était composé de :

- 66,5µl de H₂Od-PCR
- 8µl de Taq buffer 10X
- 5µl de Primers HIV AMP
- 0,5µl de Taq polymerase (5U/ µl) (Diatech)

Un volume de 80µl de ce Master-Mix a été ajouté à l'ARN préalablement retrotranscrit en ADNc. L'amplification a consisté en 35 cycles de :

- Dénaturation à 94°C 40s
- Hybridation à 60°C 45s
- Extension à 72°C 60s

Une extension finale à 72°C pendant 15mn et un hold à 4°C ont terminé la RT/PCR.

Après la réalisation de la PCR, l'ADN amplifié (les amplicons), a été mis à migrer par électrophorèse sur gel d'agarose à 3%. La révélation sous UV et la photographie ont été faite à l'aide de l'appareil Gene Flash de Sygene Bio Imaging muni d'une imprimante Mitsubishi P93. (Préparation du gel d'agarose 3% en Annexe II).

II- 5. COMITE D'ÉTHIQUE

Le comité d'éthique du Centre Médical Saint-Camille et du CERBA ont approuvé cette étude et chaque mère a donné oralement son consentement pour la collecte du sang.

II- 6. ANALYSES STATISTIQUES

Les données démographiques et cliniques ont été saisies sur Excel 2003 puis analysées avec le logiciel standard Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 12 pour windows et par le logiciel EpiInfo version 6. Le seuil de signification statistique a été fixé à $p < 0,050$.

CHAPITRE III – RÉSULTATS ET DISCUSSION

III –1. RÉSULTATS

Deux cent quatre vingt un (281) enfants, dont les mères ont consentis librement à l'exécution du test, ont subi le test du dépistage du VIH-1 par la technique de la RT/PCR de Janvier 2007 à Avril 2009. La sérologie VIH des mères a été effectuée par des tests rapides et confirmée par la méthode ELISA ; elles étaient toutes infectées par le VIH-1. La moyenne d'âge des mères était de $28,49 \pm 4,76$ ans ; et celle des enfants de $4,86 \pm 2,74$ mois.

III –1.1. Protocole de prévention de la transmission verticale du VIH-1 appliqué aux mères de l'étude

Au début de notre étude, le nouveau protocole de PTME n'avait pas encore été appliqué pour toutes les mères au CMSCO, il n'a été effectif qu'en 2007. Nous pouvions alors distinguer les mères sous le nouveau protocole et celles sous l'ancien protocole.

➤ Ancien Protocole

Pour les mères qui ont accouché avant l'instauration du nouveau protocole, la NVP leur a été administré en prophylaxie uniquement pendant le travail (200mg en prise unique), leur nouveau né avait été mis sous sirop de NVP en prise unique (2mg/kg).

➤ Nouveau Protocole

Conformément au protocole national, inspiré des recommandations de l'OMS (OMS, 2004b), les femmes VIH-1 admises au programme PTME à Saint Camille prennent sous prophylaxie de l'AZT (300mg) toutes les 12h à partir de la 28^{ème} semaine de grossesse puis en prise unique de l'AZT (300mg) + 3TC (150mg) + NVP

(200mg) au moment de l'accouchement. Après l'accouchement, elles sont mises sous AZT+3TC pendant une semaine. Le nouveau né est mis sous sirop de NVP (2mg/kg) dans les 72h après la naissance; et sous sirop d'AZT (4mg/kg/12h) pendant une (01) semaine ou un (01) mois, selon que la mère ait pris de l'AZT à partir de la 28^{ème} semaine de grossesse ou à moins de quatre (04) semaines de la naissance de l'enfant.

Les femmes éligibles sont mises sous trithérapie suivant le stade clinique et/ou immunologique atteint (Annexe III). Celles-ci n'ont plus été mises sous prophylaxie, seuls leurs enfants l'ont été.

III –1.2. Paramètres des mères

III –1.2.1. Niveau d'étude et fonction

Les mères dont les enfants ont été inclus dans l'étude avaient un âge compris entre 19 et 43 ans, soit un âge moyen de $28,49 \pm 4,76$. La tranche d'âge la plus représentée était celle de 26 à 35ans avec $N = 152$.

Parmi les mères infectées de notre étude, les femmes ménagères constituaient la catégorie la plus représentative de notre échantillon (64,41%), ensuite suivaient les commerçantes (29,54%) puis les fonctionnaires (6,05%).

Les mères analphabètes représentaient 36,65% (103/281) et celles qui avaient le niveau CEP 33,81% (95/281) ; ces valeurs allaient en décroissant, jusqu'au niveau universitaire représenté par environ 1,42% des mères. Les niveaux d'étude des mères et leurs fonctions sont donnés dans le tableau I ci-dessous.

Tableau I : Niveau scolaire et fonction des mères de l'étude

Classes d'âge : ans	Niveau de formation scolaire des femmes VIH séropositives (%)						Fonction des femmes VIH séropositives N (%)		
	N	Analphabètes	CEP	BEPC	BAC	Université	Ménagères	Commerçantes	Fonctionnaires
X<26 ans	105	39 (37,14)	37 (5,24)	20 (19,05)	7 (6,67)	2 (1,90)	78 (74,29)	22 (20,95)	5 (4,76)
26 à 35	152	54 (35,53)	51 (33,55)	32 (21,05)	15 (9,87)	0 (0,00)	93 (61,18)	47 (30,92)	12 (7,90)
X>35	24	10 (41,67)	7 (29,17)	5 (20,83)	0 (0,00)	2 (8,33)	10 (41,67)	14 (58,33)	0 (0,00)
Total	281	103/281 (36,65)	95/281 (33,81)	57/281 (20,29)	22/281 (7,83)	4/281 (1,42)	181 (64,41)	83 (29,54)	17 (6,05)

N= nombre

III –1.2.2. Taux de lymphocytes T CD4, charge virale et Traitement

Le taux de lymphocytes T CD4 des 281 mères variait de 52 à 1.077 cellules par microlitre avec une moyenne de $425,82 \pm 212,51$. Quant à leur charge virale, elle allait d'un niveau indétectable à 333.629 particules virales par ml. Ainsi les valeurs de charge virale obtenues étaient très dispersées. Nous n'avons donc pas trouvé de corrélation entre le taux de lymphocytes T CD4 et la charge virale des mères. Nous présenterons les médianes des charges virales pour chaque groupe des mères.

Des classes d'âges : 1 → 2 ; 1→3 ; 1→4 ; 2→3 et 3→4 nous n'avons pas identifié des différences statistiquement significatives ($p > 0,050$) pour les taux de lymphocytes T CD4. Cependant nous avons trouvé dans les classes 2→4 une différence statistiquement significative ($p = 0,027$) (Tableau II).

Tableau II : valeurs du taux de lymphocytes T CD4 et de la charge virale par classe d'âge des mères

Classes d'âge (par an)	Paramètres des mères			
	Nombre (pourcentage)	Moyenne d'âge	CD4*	CV**
x<26 (1)	100 (35,59)	23,77 ± 1,87	429,33 ± 207,53	87.326,00
26-30 (2)	101 (35,94)	28,58 ± 1,01	462,81 ± 232,78	926,00
31-35 (3)	57 (20,28)	32,47 ± 1,43	412,83 ± 190,06	73,00
x>35 (4)	23 (8,19)	47,39 ± 3,87	344,71 ± 203,04	24.530,80
Total	281 (100,00)	29,20 ± 12,65	425,82 ± 212,51	73,00

*: Taux de lymphocytes T CD4 en Cellules/ μ l (valeur moyenne \pm SD).

* *: Charge Virale en nombre de Copies/ml (valeur médiane).

$p(1) \rightarrow (2) = 0,283$ NS ; $p(1) \rightarrow (3) = 0,622$ NS ; $p(1) \rightarrow (4) = 0,079$ NS ; $p(2) \rightarrow (3) = 0,169$ NS ; $p(2) \rightarrow (4) = 0,027$ S ; $p(3) \rightarrow (4) = 0,159$ NS.

S= Significatif ; NS= Non Significatif.

Dans notre étude, 46,97% (132/281) des mères était sous monoprophyllaxie à la Névirapine prise unique (PU) conformément à l'ancien protocole PTME; leurs enfants avaient été mis aussi sous NVP PU en prophylaxie. Un autre groupe de femmes, représentant 31,32% (88/281) de notre échantillon avait été mis sous triprophyllaxie AZT + 3TC + NVP selon le nouveau protocole. Sur l'ensemble des mères de l'étude, 21,71% (61/281) avait été mis sous la trithérapie, conformément au nouveau protocole, associant la Zidovudine à la Lamivudine + Névirapine (Tableau III). Parmi les mères, celles qui avaient un âge compris entre 26 et 30 ans étaient pour

la majeure partie (52,48%) sous Névirapine. Ces résultats sont résumés dans le tableau III.

Tableau III : Traitement en fonction des classes d'âge des mères

Traitement	Classes d'âge (an)				Moyenne
	x<26	26-30	31-35	x>35	
NPP (%)	37 (37,00)	28 (27,72)	17 (29,82)	6 (26,09)	88 (31,32)
HAART (%)	19 (19,00)	20 (19,80)	15 (26,32)	7 (30,43)	61 (21,71)
APP (%)	44 (44,00)	53 (52,48)	25 (43,86)	10 (43,48)	132 (46,97)
Total (%)	100 (100)	101 (100)	57 (100)	23 (100)	281 (100)

Avec :

NPP = Nouveau Protocole Prophylactique associant en prise unique Zidovudine + Lamivudine + Névirapine.

APP = Ancien Protocole Prophylactique donnant la Névirapine en prise unique.

III –1.3. Evaluation de la charge virale et du taux de lymphocytes T CD4 des mères en fonction du traitement

Les mères qui étaient sous l'ancien protocole prophylactique avaient un taux de lymphocytes T CD4 moyen de $465,90 \pm 247,92$ avec une charge virale médiane de 34.882,00 copies par ml (Tableau IV).

Les mères, sous le nouveau protocole prophylactique, avaient un taux de lymphocytes T CD4 moyen de $459,93 \pm 181,01$ avec une charge virale médiane de 57.981,00 copies par ml.

Les mères ayant reçu la trithérapie avaient en moyenne un taux de lymphocytes T CD4 de $357,45 \pm 177,67$ pour une charge virale médiane de 26,67 copies par ml.

Le tableau IV ci-après montre les différentes valeurs moyennes de lymphocytes T CD4 et médianes de charge virale (CV).

Tableau IV: Charges virales et taux de lymphocytes T CD4 des mères par rapport aux différents traitements

CD4-CV/Traitement		
Traitement des mères	CD4*	CV**
NPP	$459,93 \pm 181,01$	57.981,00
HAART	$357,45 \pm 177,67$	26,67
APP	$465,90 \pm 247,92$	34.882,00
Moyenne total	$425,82 \pm 212,51$	73,00

* : charge virale valeur médiane

* : Taux de lymphocytes T CD4 valeur moyenne \pm SD

III –1.4. Transmission mère-enfant du VIH

III –1.4.1. Résultats du test de dépistage des enfants par RT/PCR

Après la migration électrophorétique des produits de la PCR, la révélation sous UV et la photographie nous donnent le profil de la figure 9.

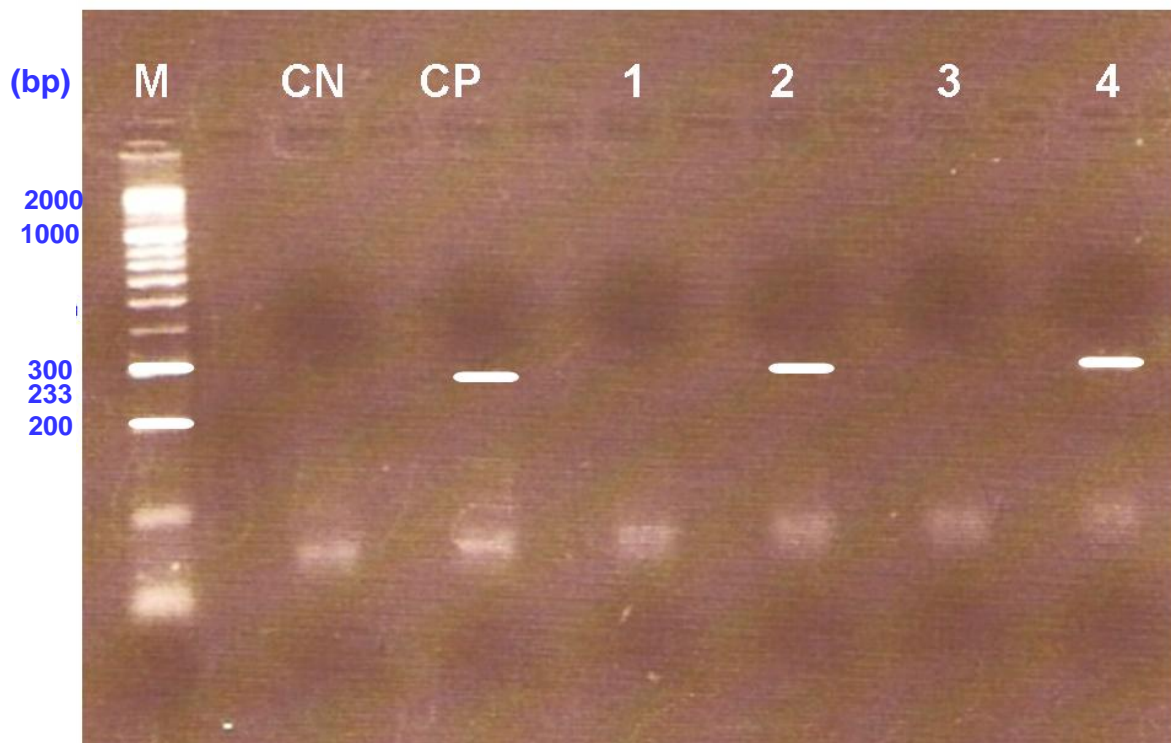


Figure9: Vérification du produit de la PCR sur le gel

Légende :

M (ladder) = marqueur de poids moléculaire.

CN= Contrôle négatif

CP= Contrôle positif

-Au niveau des puits CN, 1 et 3 : aucune bande n'est visible: échantillons négatifs en RT/PCR. Tous les échantillons qui ont donné des résultats similaires n'étaient donc pas infectés par le VIH-1, et les patients correspondants ont été déclarés VIH-1 négatifs.

-Au niveau des puits CP, 2 et 4: Il y a un produit formé entre 200 et 300 paires de base (bp); ce qui correspond à la taille du fragment attendu (233 bp). Les échantillons qui ont donné des résultats similaires ont été déclarés positifs au VIH-1.

Dans notre échantillon d'étude 16 enfants sur 281 ont été détectés positifs au VIH-1 par la technique de RT/PCR, soit 5,69% de cas de transmission verticale ; et donc 94,31% des enfants n'ont pas été infectés. Les enfants dépistés positifs ont été pris en charge avec des antirétroviraux adaptés, de même que leurs familles.

Pour l'ensemble des mères qui avaient commencé le traitement HAART, le taux de transmission a été de 0,00% (0/61). Parmi les mères qui étaient sous le nouveau protocole prophylactique, le taux de transmission a été de 4,55% (4/88) contre 9,09% parmi celles sous l'ancien protocole prophylactique (12/132). (TableauV).

Il n'y avait pas de différences statistiquement significatives entre le taux de transmission verticale parmi les mères séropositives sous le nouveau protocole prophylactique versus trithérapie HAART ; ou sous le nouveau protocole prophylactique versus ancien protocole. La différence est plutôt significative entre celles sous HAART et celles sous l'ancien protocole ($p= 0,035$).

Tableau V : Résultat RT/PCR des enfants par rapport au traitement des mères

	Nombre d'individus (%)	PCR- (%)	PCR+ (%)
HAART ¹	61 (21,71)	61 (100)	00 (0,00)
NPP ²	88 (31,32)	84 (95,45)	04 (4,55)
APP ³	132 (46,97)	120 (90,91)	12 (9,09)
Total	281 (100)	265 (94,31)	16 (5,69)

PCR- : Résultat négatif à la RT/PCR

PCR+ : Résultat positif à la RT/PCR

$P^1 \rightarrow ^3 = 0,035$ (Significatif)

$P^2 \rightarrow ^1 = 0,240$ (Non Significatif)

$P^2 \rightarrow ^3 = 0,203$ (Non Significatif)

(p calculé avec le Yate's Chi² étant donné le nombre réduit d'échantillons).

III –1.4.2. Résultats du test RT/PCR - Taux de lymphocytes T CD4 et charge virale des mères

La charge virale médiane des mères dont les enfants ont été dépistés positifs au VIH-1 a été de 161.231,00 copies par ml avec un taux de lymphocytes T CD4 moyen de 185 ± 101 cellules par μl .

Les enfants dépistés négatifs étaient nés de mères dont la charge virale médiane était de 37,71 copies par ml et le taux de lymphocytes T CD4 moyen de 440 ± 209 cellules par μl (tableau VI).

Tableau VI : Taux de lymphocytes T CD4 et charge virale des mères par rapport aux résultats RT/PCR des enfants

Résultat RT/PCR (N)	CD4	CV
Positif (16)	185 ± 101	161.231,00
Négatif (265)	440 ± 209	37,71
Total (281)	426 ± 212	73,00

CD4 : Positifs → négatifs : $p < 0,001$

N= Nombre

CD4 = Valeurs moyennes ± SD ; CV = Valeurs médianes

III –2. DISCUSSION

Pour la plupart des mères de notre étude, d'une classe d'âge à une autre, nous n'avons pas trouvé de différence statistiquement significative entre les taux de lymphocytes T CD4 ($p > 0,050$); ce qui signifie que dans notre échantillon, il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les taux de lymphocytes T CD4 lorsqu'on quitte d'une classe d'âge à l'autre. La variation du taux de lymphocytes T CD4 parmi les mères de notre étude dépendrait plutôt du stade clinique atteint.

Les mères mises sous HAART utilisaient l'association Zidovudine-Lamivudine-Névirapine ; elles avaient un taux de lymphocytes T CD4 moyen d'environ 357 ± 177 cellules/ μ l. Cette valeur est à peu près égale à celle donnée dans le protocole de traitement de l'OMS (350 cellules/ μ l); des valeurs initiales proches de nos données ont été trouvées au Centre Hospitalier Universitaire de Liège pour les patients mis sous la HAART (352 ± 244) (NKOGHE *and al.*, 2002). La combinaison Zidovudine-Lamivudine-Névirapine formant une trithérapie, constitue un des protocoles de traitement antirétroviral hautement actif (HAART: Highly Active Antiretroviral Treatment) recommandé par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

Il ressort de notre étude que le taux de transmission est plus élevé chez les femmes présentant un taux de lymphocyte T CD4 bas et une charge virale élevée ; résultat concordant avec celui obtenu dans l'étude de CAO et collaborateurs (1997). Des études ont fait ressortir en plus de cela que la carence en vitamine A joue aussi un rôle dans la transmission, et que la transmission pouvait cependant s'observer chez les patientes ayant un taux de lymphocytes T CD4 élevé et une charge virale indétectable (GREENBERG *and al.*, 1997 ; FRIPPIAT *and al.*, 1999).

La RT/PCR, utilisée comme technique diagnostique, est l'un des tests le plus fiable et standardisé pour dépister l'infection à VIH (DENIAUD *and al.*, 2002). Elle a

été utilisée par plusieurs auteurs pour détecter l'ARN viral (MAO-YUAN *and al.*, 2002; LALLEMANT *and al.*, 2005; SIMPORE *and al.*, 2006).

Le diagnostic d'infection à VIH par RT/PCR peut se faire à différentes périodes de la vie de l'enfant; son efficacité a été démontrée dans le cadre du diagnostic précoce. Mais lorsque le diagnostic par RT/PCR est très précoce il pourrait y avoir de faux positifs à cause du temps de la destruction de l'ARN messager par les phosphodiesterases. Dans l'étude de COULIBALY et collaborateurs (2005), il y a eu des cas où la PCR a été négative pour un enfant à son 45^{ème} et 90^{ème} jours de vie, mais positive au 20^{ème} mois. Chez l'enfant, le résultat n'est pas définitif car il peut y avoir aussi des transmissions (5 à 20%) en cas d'alimentation au lait maternel (OMS, 2007; HORVATH *and al.*, 2009).

Certaines études ont montré que très souvent, les mères théoriquement en allaitement artificiel strict, donnaient néanmoins le sein à leurs enfants pour diverses raisons culturelles ou sociales (COULIBALY *and al.*, 2005). Par conséquent, pour que le diagnostic par RT/PCR s'avère efficace dans le cadre de la PTME, il est donc primordial de renforcer le conseil et le suivi en termes d'alimentation du nourrisson de mères infectées par le VIH.

Ainsi malgré les sensibilisations sur la transmission mère-enfant, nous voyons qu'un certain nombre de femmes enceintes sont atteintes par le VIH et par conséquent, il faudra activer la prévention du VIH pour réduire significativement la transmission sexuelle du VIH. Pour certaines femmes, il faudrait trouver des moyens d'informations adaptés sur les voies de transmissions du VIH/SIDA car nous avons trouvé beaucoup d'analphabètes. La classe d'âge la plus représentée dans l'échantillon est celle de 26-30ans (35,90%) car c'est une période où l'activité procréative est plus développée; et donc la plupart des femmes en consultations

prénatales qu'elles soient infectées ou pas par le VIH appartiennent à cette classe (SEPOU *and al.*, 2000).

Pour réduire efficacement la proportion des enfants atteints par le VIH, il faudrait d'abord commencer par l'identification de l'infection par le VIH chez les femmes avant et pendant chaque grossesse (NIELSEN *and al.*, 2000); or l'étude de PIGNATELLI et collaborateurs (2006) a montré que moins de 18,3% des femmes enceintes acceptent faire le test de dépistage sérologique. Dans ce cas une bonne réduction de la transmission mère-enfant devrait aussi tenir compte de la formation des femmes et de leur sensibilisation sur les différentes précautions à prendre à l'encontre des différentes voies de transmission du VIH ; particulièrement pour les séropositives sur le bon suivi des traitements et des options d'alimentations de leurs enfants.

En 2007, au CMSCO, la technique de RT/PCR avait permis de détecter six (06) mois après la naissance 1,4% (3/231) d'enfants infectés par transmission verticale dont 0% (0/109) nés de mères sous trithérapie et 2,8% (3/104) nés de mères sous monoprophyllaxie à la Névirapine (SIMPORE *and al.*, 2007). Tout comme dans cette étude, il n'y a pas eu de transmission verticale avec la trithérapie; par contre le taux de transmission avec la NVP est beaucoup plus élevé dans notre étude (9,09%). En Afrique du Sud, un taux de transmission de 15,0% avait été trouvé parmi les mères sous NVP en prise unique (ROLLINS *and al.*, 2007). Au Burkina Faso SIMPORE et collaborateurs ont trouvé en 2006 un taux de transmission de 10,36% (20/193). Martinson et collaborateurs (2009) ont montré que le taux de transmission était plus élevé chez les mères exposées à la NVP pendant plusieurs grossesses précédentes (11,1%) que chez celles qui venaient d'être exposées (4,2%). Etant donné que le taux de transmission obtenu dans notre étude soit aussi élevé (9,09%), il se pourrait que de nombreuses femmes soient à leur 2^{ème} grossesse sous NVP; ce qui pourrait supposer une présence de résistances à la NVP.

Parmi les mères de notre étude qui étaient sous le nouveau protocole prophylactique AZT+3TC+NVP, le taux de transmission a été de 4,55% (4/88) contre 9,09% (12/132) avec la monoprofylaxie NVP. Nous n'avons pas trouvé de différence statistiquement significative probablement à cause du nombre d'échantillons réduit. La méthode de prophylaxie actuellement utilisée (AZT+3TC+NVP) serait plus efficace pour prévenir la transmission verticale que celle qui utilisait la monoprofylaxie à la NVP étant donné qu'une dose d'AZT+3TC était administrée aux mères après l'accouchement dans le but prévenir les résistances à la Névirapine ; résistances trouvées dans plusieurs études (LALLEMANT *and al.*, 2005, CHAPLAIN *and al.*, 2006 ; NADEMBEGA *and al.*, 2006). L'efficacité de la Zidovudine en association avec la Lamivudine + Névirapine pour la prévention de la transmission mère enfant du VIH a été démontrée par SUKSOMBOON et collaborateurs en 2007.

Le taux de transmission obtenu avec triprohylaxie dans notre étude (4,55%) est plus bas que celui obtenu avec AZT seule dans l'étude menée par SPERLING et collaborateurs en 1997 (7,6%) ; ce qui signifie qu'il y a eu une nette amélioration en terme de suivi et d'accès au traitement HAART pour les femmes éligibles. Le traitement HAART est devenu accessible grâce au programme national instauré au Burkina Faso ou dans certains pays comme le Sénégal (THIOR *and al.*, 2006). Les médicaments antirétroviraux (ARV) réduisent la réplication virale et peuvent réduire la transmission mère-enfant du VIH, soit en faisant baisser la charge virale plasmatique chez les femmes enceintes, ou à travers la prophylaxie chez leurs nouveaux nés (VOLMINK *and al.*, 2007).

Les résultats obtenus avec la NVP dans notre étude, comparés avec ceux obtenus dans certaines études sur les résistances aux traitements ARV (SIMPORE *and al.*, 2007; MARTINSON *and al.*, 2009), nous amène à supposer que les femmes sous monoprofylaxie pourraient être sujettes à des résistances; mais malgré tout, il y a

une réduction de la transmission du VIH de la mère à l'enfant. Dès lors, un dilemme se pose :

- Soit les femmes enceintes restent sans traitement avec un plus grand risque de transmission verticale.
- Soit elles sont toutes mises sous prophylaxie, et donc exposées elles et leurs enfants aux résistances, à la toxicité hématologique de l'AZT, à ses effets secondaires...
- Soit [étant donné que la différence a été significative entre le taux de transmission parmi les mères sous trithérapie HAART (0,00%) et celles sous triprophylaxie (4,55%)], administrer la HAART à toutes les femmes enceintes VIH positives comme troisième possibilité.

L'AZT comporte plusieurs effets indésirables : céphalées, nausées, douleurs abdominales, asthénies, diarrhées, éruptions cutanées et toxicité hématologique comme anémie et neutropénie (RICHMAN *and al.*, 1987). De là se pose une question éthique fondamentale : si 30% des femmes transmettent le virus à leurs enfants, est-il éthiquement licite d'exposer gratuitement à la toxicité nocive les 70% des femmes qui ne transmettront jamais le virus du SIDA à leurs enfants? Surtout qu'on sait que pour ces dernières, il n'y a aucune conséquence néfaste pour leurs enfants en l'absence de traitement par la zidovudine.

Pour effectuer cet essai, malgré le problème éthique d'intoxication des 70% des femmes qui ne transmettent pas le virus à leurs enfants, il faudrait que dans l'expérimentation clinique les bénéfices attendus soient plus importants que les risques encourus. C'est certain que le risque encouru surpasse le gain escompté chez les 70% des femmes qui n'infectent pas leurs enfants par le VIH! La problématique se précise comme suit : comment distinguer les femmes qui transmettront le virus à leurs enfants de celles qui ne le transmettront guère?

Mais puisqu'il n'est pas possible de savoir à l'avance quels nouveau-nés seraient épargnés par l'infection et lesquels ne le seraient pas, le protocole de PTME pourrait se poursuivre normalement sans porter préjudice aux normes éthiques.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION

La technique de la RT/PCR nous a permis de détecter seize (16) enfants positifs sur deux cent quatre vingt un (281) soit 5,69% de cas de transmission. Aussi l'étude des dossiers cliniques des mères nous a permis de déterminer le taux de transmission résiduel avec des méthodes de prévention au Burkina Faso qui est de 0,00% avec la trithérapie HAART; 9,09% avec la monoprohylaxie NVP; 4,55% avec la triprohylaxie AZT+3TC+NVP.

Ainsi, l'utilisation de tests de biologie moléculaire - telle la réaction de polymérisation en chaîne associée à une transcription inverse (RT/PCR) - comme technique de routine au Burkina Faso et dans les autres pays en voie de développement, pour le diagnostic précoce de l'infection à VIH chez les enfants permettra d'améliorer l'intervention de la prévention de la transmission mère-enfant du VIH; elle permettra du même coût, de tester l'efficacité de cette prévention. Il reste à examiner l'accessibilité financière de ce test aux populations des pays en voie de développement. Toutefois, pour éradiquer cette transmission mère enfant du VIH, il faudrait développer un vaccin thérapeutique et préventif anti-VIH/SIDA au niveau pédiatrique.

PERSPECTIVES

Comme perspectives, c'est de pouvoir continuer l'analyse pour prouver l'efficacité de la triprophylaxie en utilisant un nombre d'échantillons plus élevé.

Nous pouvons encore améliorer le protocole de la PTME à cause des résistances qui s'installent; surtout que les mères VIH séropositives qui ont accouché pourront être encore enceintes et devront donc être prises en charge par des ARV pour bloquer la transmission verticale. Nous pourrions faire des études sur les résistances suscitées par la prise des ARV chez ces mères VIH séropositives comme chez leurs enfants.

Des études sur le génotypage et l'identification des souches de VIH circulantes au Burkina Faso pourront contribuer à l'élaboration d'un vaccin thérapeutique pédiatrique contre le VIH/SIDA.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1) **ASSAL A., COSTE J., BARLET V., LAPERCHE S., CORNILLOT C., SMILOVICI W., PILLONEL J., ANDREU G., 2003.** Application de la biologie moléculaire à la sécurité virale transfusionnelle : le dépistage génomique viral. *Transfusion Clinique et Biologique*. 10 (3): 217-226.
- 2) **BELAN A. G., CHAPLAIN C., A. BOUSSAIRI, 2008.** Suivi biologique de l'infection à VIH chez l'adulte. *Immuno-analyse et Biologie Spécialisée*. 23 (2): 95-102.
- 3) **CAO Y., KROGSTAD P., BETTE T. KORBER, RICRARD A. KOUP, MULDOON M., MACKEN C., SONG J.-L., JIN Z., ZHAO J.-Q., CLAPP S., IRVIN S. Y. CHEN , DAVID D. HO, ARTHUR J. AMMANN, 1997.** Maternal HIV-1 viral load and vertical transmission of infection: the Ariel Project for the prevention of HIV transmission from mother to infant. *Nature Medicine*. 3 : 549-552.
- 4) **CHAPLAIN C., GREDEBELAN A., 2006.** Suivi biologique de l'infection VIH : intérêt du génotypage pour la résistance et du dosage des antirétroviraux. *Spectra Biologie*. 25 (151): 42-47.
- 5) **CNLS-IST (Conseil National de Lutte contre le SIDA et les IST), 2009.** 8ème session ordinaire. www.cnls.bf/.
- 6) **COULIBALY M., NOBA V., REY J.-L., MSELLATI P., EKPINI R., CHAMBON J-F., MALKIN J-E., 2005.** Evaluation d'un programme de prévention de la transmission mère-enfant du VIH à Abidjan (Côte d'Ivoire/1999-2002). *Médecine tropicale*. 66 (1): 53-58.
- 7) **COUtlÉE F., 1994.** Molecular diagnosis of HIV-1 infection: potential roles and applications. *Union Médicale du Canada*. 123 (6): 348-358.
- 8) **DEHEE A., 2003,** Les différentes techniques de quantification des génomes viraux. *Revue Française des Laboratoires*. 351: 23-29.
- 9) **DENIAUD F. ET MELMAN C., 2002.** De l'appréhension des maladies sexuellement transmissibles à la prévention du VIH. *Presse médicale*. 31 (9): 387-392.

- 10) **DSF (Direction de la Santé et de la Famille.) Burkina Faso, 2006.**
Programme National de Prévention de la Transmission Mère Enfant du VIH
2006-2010. <http://www.sante.gov.bf/SiteSante/documents/dsf/ptme-2006-2010.pdf>.
- 11) **ECOLE DE L'ADN, NIMES.** La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) :
Principe et applications. <http://www.ecole-adn.fr>.
- 12) **EKPINI R. E., GILKS C., 2005.** Antiretroviral regimens for preventing HIV
infection in infants. *Bulletin of the World Health Organization.* 83 (7): 489-
494.
- 13) **FREEMAN W. M., WALKER S. J., VRANA K. E., 1999.** Quantitative RT-PCR:
Pitfalls and Potential. *BioTechniques.* 26 (1): 112-122.
- 14) **FRIPPIAT F., VANDERCAM B., HUBINONT C., PETIT N., SPERANDEO D.,
MOREAU M., GENNOTTE A. F., GASTAUT J. A., 1999.** Infection par le virus
de l'immunodéficience humaine et grossesse: généralités et considérations
thérapeutiques actuelles. *Louvain Medical.* 118: 13-21.
- 15) **GARRAIT V., MOLINA J. M., 2001.** Nouvelles stratégies de traitement
antirétroviral chez les patients infectés par le VIH. *Pathologie Biologie.* 49 (1):
67-71.
- 16) **GREENBERG B. L., SEMBA R. D., VINK P. E., FARLEY J. J.,
SIVAPALASINGAM M., STEKETEE R. W., THEA D. M., SCHOENBAUM E. E.,
1997.** Vitamin A deficiency and maternal-infant transmissions of HIV in two
metropolitan areas in the United States. *AIDS.* 11(3):325-32.
- 17) **GUEUDIN M., PLANTIER J. C., DAMOND F., BRAUN J., AYOUBA A.,
MAUCLERE P., ROQUES P., SIMON F., 2003.** Infections par les VIH-1 du
groupe O: épidémiologie, diagnostic et suivi virologique. *La Lettre de
l'infectiologue.* 18 (5): 176-184.
- 18) **HORVATH T., MADI B. C., IUPPA I. M., KENNEDY G. E., RUTHERFORD G.,
READ J. S., 2009.** Interventions for preventing late postnatal mother-to-child

transmission of HIV. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Issue 1.
<http://www.cochrane.org/reviews/en/ab006734.html>.

- 19) **HU DALE J., VANICHSENI S., MASTRO T. D., RAKTHAM, YOUNG N. L., MOCK P. A., SUBBARAO S., PAREKH B. S., SRISUWANVILAI L-O, SUTTHENT R., WASI C., HENEINE W., CHOOPANYA K., 2001.** Viral load differences in early infection with two HIV-1 subtypes. *AIDS*. 15 (6): 683-691.
- 20) **KIM B. C., JU MK, DAN-CHIN-YU A., SOMMER P., 2009.** Quantitative Detection of HIV-1 Particles Using HIV-1 Neutralizing Antibody-Conjugated Beads. *Analytical Chemistry*. 81 (6): 2388–2393.
- 21) **KLIMKAIT T., 2008.** Test VIH. *Forum Médical Suisse*. 8 (15): 278-281.
- 22) **LALLEMANT M., GONZAGUE JOURDAIN G., LE COEUR S., NGO-GIANG-HUONG N., THAINEUA V., 2005.** Prévention de la transmission mère-enfant du VIH: un protocole simple, d'une efficacité remarquable. *Médecine/Sciences*. 21 (1): 28-29.
- 23) **LAUNAY O., 2008.** Thérapeutiques antirétrovirales : principes du traitement de l'infection par le VIH. *Presse Médicale*. 37 (6): 1022-1032.
- 24) **MAIGA M. A., TURCOTTE F., DOUCOURE A., SANOGO B., SIDIBE D., DICKO I.S. ET COMITE -SIDA DU MALI, 1992.** Séroprévalence des anticorps contre le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) chez les femmes enceintes de Bamako et de Selingue (Mali). *Medecine d'Afrique*. 39 (2): 94-98.
- 25) **MAO-YUAN C., WEI-KUNG W., MING-CHENG L., SHING-JER T., SHIOW-ING W., AND CHUN-NAN L., 2002.** Rapid Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype E Infection by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 40 (10): 3805–3809.
- 26) **MARTINSON N. A., MORRIS L., JOHNSON J., GRAY G. E., PILLAY V., LEDWABA J., DHLAMINI P., COHEN S., PUREN A., STEVEN J., HENEINE W., MCINTYRE J., A., 2009.** Women exposed to single-dose nevirapine in successive pregnancies: effectiveness and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. *AIDS*. 27(7): 809-16.

- 27) **MORROW G., VACHOT L., VAGENAS P., ROBBIANI M., 2007.** Current Concepts of HIV Transmission. *Current HIV/AIDS Reports*. 4: 29–35.
- 28) **NADEMBEGA W. M., GIANNELLA S., SIMPORE J., CECCHERINI-SILBERSTEIN F., PIETRA V., BERTOLI A., PIGNATELLI S., BELLOCCHI M.C., NIKIEMA J.B., CAPPELLI G., BERE A., COLIZZI V., PERNO C. P., AND MUSUMECI S., 2006.** Characterization of Drug-Resistance Mutations in HIV-1 Isolates From Non-HAART and HAART Treated Patients in Burkina Faso. *Journal of Medical Virology*. 78 (11): 1385–1391.
- 29) **NIELSEN K. M. D., MPH AND BRYSON I. J. M. D., 2000.** Diagnosis of HIV infection in children. *Pediatric Clinics of North America*. 47 (1): 39-63.
- 30) **NKOGHE D., LEONARD P. NNEGUE S., MOUTSCHEN M., DEMONTY J., 2002.** Prise en charge des patients infectés par le VIH: Expérience du CHU de Liège RMLG. *Revue Médicale de Liège*. 57 (8) : 546-551.
- 31) **OMS (Organisation mondiale de la Santé), 2002.** La prévention de l'infection au VIH chez les nourrissons et les jeunes enfants. www.who.int/hiv/mtct/PreventionInfantsReviewF.pdf.
- 32) **OMS (Organisation mondiale de la Santé), 2004a.** Étude de cas: Prévention de la Transmission Mère Enfant du VIH/SIDA au Burkina Faso: une démarche contractuelle originale. www.emro.who.int/aiecf/web8.pdf.
- 33) **OMS (Organisation mondiale de la Santé), 2004b.** Améliorer l'accès aux traitements antirétroviraux dans les pays à ressources limitées : recommandations pour une approche de santé publique. <http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/adult/en/index.html>.
- 34) **OMS (Organisation mondiale de la Santé), 2005.** La transmission du VIH par l'allaitement au sein : Bilan des connaissances actuelles. whqlibdoc.who.int/publications/2005/9242562718_fre.pdf.
- 35) **OMS (Organisation Mondiale de la Santé), 2006.** Rapport sur l'épidémie mondiale de SIDA : résumé d'orientation. <http://www.unaids.org>.

- 36) **OMS (Organisation mondiale de la Santé), 2007.** Guide pour la mise à l'échelle au plan mondial de la prévention de la transmission mère-enfant du VIH. www.who.int/hiv.
- 37) **OMS (Organisation mondiale de la Santé), 2008.** Rapport sur l'épidémie mondiale de SIDA: Traitement et prise en charge. <http://www.unaids.org>.
- 38) **ONUSIDA/OMS (Programme commun des Nations Unies sur le VIH/SIDA (ONUSIDA) et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)), 2007.** Rapport : Le point sur l'épidémie de sida. <http://www.unaids.org>.
- 39) **PIGNATELLI S., SIMPORE J., PIETRA V., OUEDRAOGO L., CONOMBO G., SALERI N., PIZZOCOLO C., DE IACO G., TALL F., OUMINGA A., CAROSI G., CASTELLI F., 2006.** Factors predicting uptake of voluntary counselling and testing in a real-life setting in a mother-and-child center in Ouagadougou, Burkina Faso. *Tropical Medicine and International Health*. 11(3): 350-357.
- 40) **PLANTIER J.-C., SIMON F 2002.** Diagnostic sérologique des infections à VIH. *Développement et Santé*. n°162.
- 41) **REVILLARD J. P., ASSOCIATION DES ENSEIGNANTS D'IMMUNOLOGIE DES UNIVERSITÉS DE LANGUE FRANÇAISE (ASSIM), 2001.** Immunologie. Edition 4. *De Boeck Université*. ISBN 2804138054. 600 pp.
- 42) **REYNIER P., MALTHIERY Y., 1996.** PCR longue: progrès récents et application à l'étude des délétions de l'ADN mitochondrial. *Médecine/sciences*. 12:1011-1016.
- 43) **RICHMAN D. D., FISCHL M. A., GRIECO M. H., GOTTLIEB M. S., VOLBERDING P. A., LASKIN O. L., LEEDOM J. M., GROOPMAN J. E., MILDVAN D., HIRSCH M. S., and al 1987.** The toxicity of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *New England Journal of Medicine*. 317 (4):192-197.
- 44) **ROLLINS N., LITTLE K., MZOLO S., HORWOOD C., NEWELL MARIE-L., 2007.** Surveillance of mother-to-child transmission prevention programmes at

- immunization clinics: the case for universal screening. *AIDS*. 21 (10) : 1341-1347.
- 45) **ROQUEBERT, F. DAMOND, F. BRUN-VEZINET AND D. DESCAMPS, 2009.** Diversité génétique des VIH et ses conséquences. *Pathologie Biologie*. 57 (2) : 142-148.
- 46) **SCHNEIDER V., 2003.** Quantification génomique: applications aux infections par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV). *Revue Française des Laboratoires*. (351) : 31-34.
- 47) **SEPOU A., YANZA M.C., NGUEMBI E., BANGAMINGO J-P., NALI M.N., 2000.** Les consultations prénatales en zone sémi-urbaine centrafricaine : fréquence, facteurs influençants, pronostic maternel et néonatal. *Médecine Tropicale*. 60 : 257-261.
- 48) **SIMPORE J., PIETRA V., PIGNATELLI S., KAROU D., NADEMBEGA W. M., ILBOUDO D., CECCHERINI-SILBERSTEIN F., GHILAT-AVOID-BELEM W. N., BELLOCCHI M. C., SALERI N., SANOU M. J., OUEDRAOGO C. M., NIKIEMA J. B., COLIZZI V., PERNO C. P., CASTELLI F., MUSUMECI S., 2007.** Effective program against mother-to-child transmission of HIV at Saint Camille Medical Centre in Burkina Faso. *Journal of Medical Virology*. 79 (7): 873-879.
- 49) **SIMPORE J., PIETRA V., SAVADOGO A., PIGNATELLI S., NIKIEMA J. B., NADEMBEGA W. M., YARA J., ZOUNGRANA N., BAKOUAN D., COLIZZI V., CASTELLI F., MUSUMECI S., 2006.** Reduction of mother-to-child transmission of HIV at Saint Camille Medical Centre in Burkina Faso. *Journal of Medical Virology*. 78 (2):148-152.
- 50) **SPERLING R. S., SHAPIRO D. E., COOMBS R. W., TODD J. A., HERMAN S. A., MCSHERRY G. D., O'SULLIVAN M. J., VAN DYKE R. B., JIMENEZ E., ROUZIOUX C., FLYNN P. M., SULLIVAN J. L., 1996.** Maternal viral load, zidovudine treatment, and the risk of transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mother to infant. *Pediatric AIDS Clinical*

- Trials Group Protocol 076 Study Group. *New England Journal of Medicine*. 335(22): 1621-1629.
- 51) **SUKSOMBOON N., POOLSUP N., KET-AIM S., 2007.** Systematic review of antiretroviral therapies for reducing the risk of mother-to-child transmission of HIV infection. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 32 (3) : 293-311.
 - 52) **TARNAGDA Z., DRABO K. M., YARO S., YOUGBARÉ I., ANDONABA J. B., 2003.** Diagnostic des infections par les virus de l'immunodeficiency humaine à Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. *Médecine d'Afrique Noire*. 50 (7): 331-335.
 - 53) **THEZE J., 2008.** CD4 lymphocytes as targets and actors in the pathogenesis of HIV infection--therapeutic implications. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*. 192 (7): 1453-1466.
 - 54) **THIOR I., LOCKMAN S., SMEATON LAURA M., SHAPIRO ROGER L., WESTER C., HEYMANN S. JODY, GILBERT PETER B., STEVENS L., PETER T., KIM S., VAN WIDENFELT E., MOFFAT C., NDASE P., ARIMI P., KEBABETSWE P., MAZONDE PATSON, MAKEMA J., MCINTOSH K., NAVITSKY V., TUN-HOU L. , MARLINK R., LAGAKOS S., ESSEX M., 2006.** Breastfeeding plus infant Zidovudine prophylaxis for 6 months vs feeding plus infant Zidovudine for 1 month to reduce mother-to-child HIV transmission in Botswana. *Journal of the American Medical Association*. 296 (7): 794-805.
 - 55) **TUBIANA R. AND KATLAMA C., 1997.** Les traitements antirétroviraux. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 27 (1): 23-30.
 - 56) **UNAIDS (United Nations Programm on HIV/AIDS), 2008.** Report on global AIDS epidemic: estimate and data, 2007 and 2001. www.unaids.org.
 - 57) **VOLMINK J, SIEGFRIED N, VANDER MERWE L., BROCKLEHURST P., 2007.** Antiretrovirals for reducing the risk of mother-to-child transmission of HIV infection. *Cochrane Database of Systematic Reviews 2007*, Issue 1. <http://www.cochrane.org/reviews/en/ab006734.html>.

- 58) **WATSON J. D., GILMAN M., REVELANT O., WITKOWSKI J., ZOLLER M., 1994.** ADN recombinant. Edition 2. *De Boeck*, Bruxelles. ISBN 2804115976. 642pp.
- 59) **Yaffe S. J., Aranda J. V., 2004.** Neonatal and pediatric pharmacology. Edition 3. *Lippincott Williams & Wilkins*, New York. ISBN 0781741858. 938 pp.

ANNEXES

Annexe I : Extraction de l'ARN viral à partir du plasma par la méthode Analytik jena

A- LYSE DES LEUCOCYTES

- 1- 450µl de Lysis Solution **RL** + 150µl de plasma dans un tube d'extraction de 1,5ml
- 2- Passer au vortex
- 3- Incuber 15mn à température ambiante (vortex chaque 3-4mn)
- 4- Centrifuger pendant un court temps

B- SEPARATION DES ACIDES NUCLEIQUES

- 1- Ajouter 600µl de Binding Solution **RBS** à l'échantillon lysé
- 2- Passer vigoureusement au vortex
- 3- Transférer 650µl de l'échantillon dans le filtre muni d'un tube collecteur
- 4- Centrifuger 1mn à 10000g (12000rpm) + écarter le tube collecteur
- 5- Insérer le filtre dans un nouveau tube collecteur
- 6- Transférer le volume restant (550µl) du lysa dans le même filtre
- 7- Centrifuger 12000rpm pendant 1mn

C- PURIFICATION DES ACIDES NUCLEIQUES

- 1- Insérer le filtre dans un nouveau tube collecteur.
- 2- Ajouter 500µl de Washing Solution **HS** dans le filtre
- 3- Centrifuger 1mn à 12000rpm
- 4- Ecarter le tube collecteur + insérer le filtre dans un nouveau tube collecteur
- 5- Ajouter 650µl de Washing solution **LS**
- 6- Centrifuger 1mn à 12000rpm
- 7- Changer de tube collecteur
- 8- Centrifuger 2 mn à la vitesse maximale (14000rpm) pour éliminer toute trace d'éthanol
- 9- Ecarter le tube collecteur

D- ELUTION

- 1- Transférer le filtre dans un tube d'éluion de 1,5ml
- 2- Ajouter 60µl de RNase free (ou 30 + 30 = éluion d'une grande quantité d'ARN)
- 3- Incuber 2mn à la température ambiante
- 4- Centrifuger pendant 1mn à 12000rpm
- 5- Conserver le tube d'éluion contenant l'ARN élué au frais (-20°C).

AnnexeII : Préparation du gel d'agarose

-Préparation de gel d'agarose

* Préparation du TBE (solution tampon Tris/Borate/EDTA) 1X à partir du TBE 10X : tampon de course

Dilution 1/10 : 100ml de TBE10X +900ml H₂O → solution de 100ml de TBE 1X

* Préparation du gel d'agarose 3%

3g d'agarose +100ml de TBE 1X

Cuisson à micro onde (2mn, 460W)

Ajout de 2µl de Bromure d'Ethidium

Le gel est coulé délicatement dans la cuve à électrophorèse (HYBAID)

* Dépôt des échantillons sur le gel en s'assurant que le tampon de migration préalablement versé dans la cuve couvre de quelques millimètres le gel.

5 µl de tampon d'éluion

10 µl d'ADNc amplifié

15 µl du ladder dans le puit n°1.

} Par échantillon/puit

- Electrophorèse et Révélation sous UV

Course de l'électrophorèse : 100V pour 60minutes

Révélation sous UV - Photo

Annexe III : Protocole de prévention de la TME/VIH

Régime de traitement	Temps d'administration		
	Pendant la grossesse	Pendant le travail	En post-partum
Régime retenu	AZT 300 mg x 2/jour à partir de la 28 ^{ème} semaine de grossesse	NVP 200 mg en dose unique + AZT/3TC : 300mg/150mg en prise unique	<u>Mère</u> : AZT/3TC 300/150mg x 2/jour pendant 7jours <u>Enfant</u> : NVP (2mg/kg en dose unique) + AZT 4mg/kg X 2 /jour pendant 7jours
Alternative		NVP 200 mg en dose unique + AZT/3TC : 300mg/150mg en prise unique	<u>Mère</u> : AZT/3TC x7 jours <u>Enfant</u> : NVP (2mg/kg en dose unique) + AZT 4mg/kg X 2 /jour pendant 4 semaines

1) Si la mère a reçu moins de 4 semaines d'AZT pendant la grossesse, l'enfant devrait recevoir 4 semaines d'AZT au lieu d'une semaine.

2) Si la mère est éligible pour le traitement ARV, administrer le traitement. Dans ce cas elle ne prend plus le traitement prophylactique et à la naissance l'enfant devrait recevoir le traitement du post partum.

Classification OMS de l'infection à VIH	
Classification	Stade clinique OMS
Asymptomatique	1
Modéré	2
Avancé	3
Sévère	4

(OMS, 2004b; DSF Burkina, 2006).