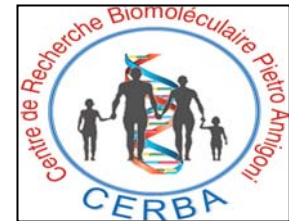




UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU
Unité de Formation et de Recherche
Sciences de la Vie et de la Terre
(UFR-SVT)

BURKINA FASO



Centre de Recherche
Biomoléculaire (CERBA)
Laboratoire de Biologie

MEMOIRE

Présenté par :

NAGALO BOLNI MARIUS,

Maître ès Sciences

Pour l'obtention du:

Diplôme d'Etudes Approfondies en Biotechnologie

Option : *Génétique / Biologie Moléculaire*

Sciences Biologiques Appliquées

SUR LE THÈME :

**Diagnostic moléculaire, par RT/PCR,
du VIH-1 et sécurité transfusionnelle.**

Soutenu le 25-05-2010, devant le jury :

Président du jury: Pr. Jean Didier ZONGO, Université de Ouagadougou (UFR/SVT)

Membres du jury: Pr. Jacques SIMPORE, Université de Ouagadougou (UFR/SVT)

Dr. Mahamoudou SANOU, Université de Ouagadougou (UFR/SDS)

DÉDICACE

À mon Père NAGALO .W. MICHEL

À ma mère DAO AMINATA,

À mes Frères et à ma soeur :

Nicolas , Casimir,

Natacha.

À mon amie de toujours Murielle C B .H Compaoré.

A Tous ceux qui se battent pour faire avancer

La science en AFRIQUE.



DONNER SON SANG C'EST SAUVER UNE VIE.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au laboratoire du Centre National de transfusion sanguine et au Centre de Recherche Biomoléculaire Pietro ANNIGONI (CERBA/LABIOGENE). Nous exprimons nos profondes gratitudee :

***Au Professeur Jean.D.ZONGO**, pour nous avoir écouté, conseillé et reçu dans le laboratoire de génétique*

***Au Professeur Jacques SIMPORE**, notre Directeur de mémoire pour avoir guidé nos premiers pas dans la recherche. Il nous a reçue au Cerba-Labiogene où nous avons bénéficié de son encadrement scientifique et de son soutien moral et matériel.*

***Au Professeur Iassané SANGARE** pour l'intérêt qu'il a porté à notre étude et ses conseils.*

***Au Docteur Mahamoudou SANOU**, directeur du Centre national de Transfusion Sanguine pour nous avoir accepté au CNTS et également pour ses conseils et sa collaboration sans faille.*

***Au Docteur Yacouba NEBIE**, au CNTS pour ses conseils et sa disponibilité.*

***Au Docteur Alice KOUMARE**, au CNTS pour son soutien pendant la période de collecte.*

À Mr Cyrille BISSEYE pour son amitié et pour son aide précieuse au cours des manipulations au laboratoire.

À M.Dramane Coulibaly, directeur d'Univers biomédical pour son engagement dans la recherche scientifique, son soutien et sa compréhension.

À M. Alphonse Yougbaré, agent à Univers biomédical pour son amitié.

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

À toute l'équipe du Laboratoire du Centre de Transfusion Sanguine, A. BONKOUNGOU, SARE, NAGBILA, BAMOGO, KABORE et à tous leurs collègues.

À mes aînées et promotionnaires de DEA au Laboratoire de génétique de l'université de Ouagadougou (UFR/SVT), M.BATIONO, Romaric N., Ernest T., Baloua.N, Gapili. N, Fidele .T, Hervé N., Issoufou.T, Djakaridja.T, Noufou O., Inoussa.C, Pelega.K et à Mademoiselle Tany Sangna.

À nos oncles et tantes, cousins et cousines, merci pour vos encouragements.

À nos amis qui ont toujours été présents pour nous soutenir.

À tous nos promotionnaires qui nous ont inspiré force et courage pour avancer dans nos études scolaires et universitaires, Merci.

SOMMAIRE

DEDICACE.....	ii
REMERCIEMENTS.....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES ANNEXES.....	x
SIGLES ETABREVIATIONS.....	xi
RESUME.....	xiii
SUMMARY.....	xiv
I- HISTORIQUE.....	1
I.1 DECOUVERTE ET EMERGENCE DU VIH.....	2
I.2 BIOLOGIE DU VIRUS DU SIDA.....	3
I.2.1 GENOME ET PROPRIETES STRUCTURALES DU VIH-1.....	3
I.2.2 INFECTIOSITE DU VIH ET ASPECTS IMMUNOLOGIQUES.....	4
I.2.2.1 REACTION IMMUNITAIRE DE L'HOTE FACE A L'INFECTION.....	6
I.3 SITUATION MONDIALE DE L'ÉPIDEMIE A VIH.....	6
I.3.1 EPIDEMIOLOGIE DU VIH/SIDA ET DES IST AU BURKINA FASO.....	7
I.3.2 MODES DE TRANSMISSIONS ET TRAITEMENTS.....	8
I.3.2.1 TRANSMISSIONS.....	8
I.3.2.2 TRAITEMENTS.....	9
I.4 DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES INFECTIONS A VIH.....	11
I.4.1 PRINCIPE DES TESTS DE DEPISTAGE.....	11
I.41 STRATEGIES ALTERNATIVES POUR LA CONFIRMATION DES INFECTIONS A VIH.....	13

I.4.2 CHOIX D'UNE STRATEGIE.....	14
I.4.3 UTILISATION ET FIABILITE DES TESTS RAPIDES (TDR).....	16
I.5 LA TRANSFUSION SANGUINE.....	17
I.5.1 RISQUES TRANSFUSIONNELLES.....	18
I.5.2 LE RISQUE RESIDUEL.....	20
I.6 BIOLOGIE MOLECULAIRE ET SECURITE TRANSFUSIONNELLE.....	21
II-DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DU VIH PAR RT/PCR.....	23
II.1 LA REACTION DE LA PCR.....	24
II.1.1 LES ETAPES DE LA PCR.....	24
II.2 LA RÉTROTRANSCRIPTASE / PCR (RT / PCR).....	26
II.2.1 LA RT/PCR QUANTITATIVE : LA CHARGE VIRALE.....	26
II.2.2 LA RT/PCR QUALITATIVE.....	27
II.2.3 RÉALISATION D'UNE RT/PCR	27
II.2.3.1 SYNTHÈSE DE L'ADN _c	27
II.3 EFFICACITE DE LA PCR.....	29
II.4 AUTRES TECHNIQUES DERIVÉES.....	30
II.4.1 PCR MULTIPLEX.....	30
II.4.2 PCR EN TEMPS REEL (REAL TIME PCR).....	30
III- PROBLÉMATIQUE.....	31
III.1 ENONCE DU PROBLEME ET CONTEXTE JUSTIFICATIF DE L'ETUDE.....	32
IV- OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	34
IV.1 OBJECTIF PRINCIPAL.....	35
IV.2 OBJECTIFS SPÉCIFIQUES.....	35

V- MATÉRIELS ET DÉMARCHES MÉTHODOLOGIQUES.....	36
V.1 CADRE DE L'ETUDE ET DEROULEMENT DES TRAVAUX.....	37
V.2 COLLECTE DES ECHANTILLONS.....	37
V.3 CHOIX DES DONNEURS DE SANG.....	37
V.3.1 CRITERES D'INCLUSION.....	38
V.3.2 CRITERES D'EXCLUSION.....	38
V.4 PRÉSENTATION DES TESTS.....	39
V.4.1 LE TEST VIRONOSTIKA (BIOMERIEUX, PAYS BAS).....	39
V.4.1.2 PRINCIPE DU TEST VIRONOSTIKA VIH UNI- FORM II AG/AB.....	39
V.4.2 AXSYM VIH AG / AB COMBO II.....	41
V.4.2.1 PRINCIPE DE LA METHODE.....	41
V.4.3 DETERMINE VIH -1/2 (ABOTT, DIVISION DIAGNOSTIC, FRANCE).....	43
V.4.3.1 PRINCIPE DE LA METHODE.....	43
V.4.4 SD BIOLINE VIH-1/2 3.0 (MULTI).....	45
V.4.5 IMMUNOCOMB II (ORGENICS, FRANCE).....	46
V.5 DIAGNOSTIC MOLECULAIRE PAR RT/PCR DU VIH-1.....	49
V.5.1 ELABORATION DES POOLS D'ECHANTILLONS (CERBA-Labiogene).....	49
V.5.2 EXTRACTION DE L'ARN VIRAL (kit d'extraction Analytikjena).....	49
V.5.3 OBTENTION DE L'ADN _C	50
V.5.4 PREPARATION DU GEL D'AGAROSE.....	51
V.6 ANALYSES STATISTIQUES.....	52
V.6.1 PERFORMANCES DES TESTS UTILISES.....	52

VI-RESULTATS ET DISCUSSION	54
VI- 1 RESULTATS.....	55
VI.1.1 PARAMÈTRES DES DONNEURS.....	55
VI.1.2 SYSTEMES D’ANALYSES ET STATUT VIH.....	56
VI.1.3 EVALUATION DU STATUT VIH EN FONCTION DU TYPE DE DONNEURS....	57
VI.1.4 EVALUATION DES TESTS RAPIDES EN FONCTION DU STATUT VIH.....	57
VI.1.5 COMPARAISON ENTRE LE STATUT VIH, LES TYPES DE DONNEURS ET LES CO-INFECTIONS.....	59
VI.1.6 RESULTATS DE LA RT/PCR SUR LES POOLS ET LES ECHANTILLONS INDIVIDUELS.....	60
VI.1.6.1 DETERMINATION DE LA CHARGE VIRALE PLASMATIQUE (CVP).....	62
VI.1.6.2 PERFORMANCES DES TESTS ELISA ET AXSYM.....	63
VI.1.6.4 PERFORMANCES DES TESTS RAPIDES(TDR).....	63
VI.2 DISCUSSION.....	65
VII-CONCLUSION ET PERSPECTIVES	72
VII.1 CONCLUSION.....	73
VII.2 PERSPECTIVES.....	74
VIII-REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	75

LISTE DES TABLEAUX.

Tableau I: Cas de VIH par tranche d'âge en 2007 comparées aux données de 2008.....	8
Tableau II : Indications des stratégies alternatives.....	15
Tableau III: Appariement des bases dans la synthèse de l'ADN _C	28
Tableau IV : Résultats AXSYM VIH Ag/Ab Combo.....	42
Tableau V : Résumé du mode opératoire AXSYM VIH Ag/Ab Combo.....	47
Tableau VI: Caractéristiques des échantillons (Sexe, Types de donneurs, Statut VIH et Catégories des donneurs).....	56
Tableau VII: Statut sérologique des échantillons à tester par PCR.....	57
Tableau VIII : Comparaison entre les Types de donneurs et le Statut VIH des échantillons.....	57
Tableau IX-1 : Statut sérologique des échantillons suite au test VIH par le kit Determine.....	58
Tableau IX-2 : Statut sérologique des échantillons suite au test VIH par le kit SD-Bioline	58
Tableau IX-3 : Statut sérologique des échantillons suite au test VIH par le kit ImmunoComb	58
Tableau X : Types de donneurs, Statut VIH des échantillons et Co-Infections.....	59
Tableau XI : Résultats de la RT/PCR sur les pools.....	61
Tableau XII : Résultats de la charge virale sur 10 échantillons.....	62
Tableau XIII : Résumé des performances de l'ELISA et de l'AXSYM.....	63
Tableau XVI Performances des TDR : Determine, SD-Bioline et ImmunoComb.....	64

LISTE DES FIGURES.

Figure 1 : Schéma du VIH-1.....	3
Figure 2 : Gènes de structures du VIH-1/2.....	4

Figure 3 : Cycle de réplication du VIH.....	5
Figure 4 : Situation mondiale de l'épidémie à VIH/SIDA.....	6
Figure 5 : Cinétique d'apparition des anticorps anti-VIH-1.....	22
Figure 6 : Les différentes étapes de la PCR.....	25
Figure 7 : Schéma simplifié du principe de la réaction de transcription inverse en présence d'amorce polyT.....	28
Figure 8 : La synthèse du second brin d'ADNc par la Taq polymérase.....	29
Figure 9 : Spectrophotomètre lecteur de microplaques et appareillage de l'AXSYM VIH-1/2 Combo.....	48
Figure 10 : Test rapide Immunocomb II VIH-1/2.....	48
Figure 11 : Photos de tests rapides VIH (à gauche Determine™ VIH-1/2 Inverness et à droite SD Bioline).....	48
Figure 12 : Thermocycleur 9700(Applied Biosystems).....	51
Figure 13 : Révélation du produit de la PCR sur Gel des pools d'échantillons.....	60
Figure 14 : Real time PCR ABBOTT M2000 RT 7500 Applied Biosystems.....	62

LISTE DES ANNEXES

ANNEXES 1 : Réactifs recommandés au niveau national (processus dynamique).....	85
ANNEXES 2 : Conduite à tenir devant l'interprétation d'un WB-VIH-1.....	86
ANNEXES 3 : Les marqueurs biologiques de l'infection due au VIH/ terminologie des analyses de détection des Ac-anti-VIH.....	88

SIGLES ET ABRÉVIATIONS.

3TC : Lamivudine

Ac : Anticorps

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

Ag : **Antigène**

AgHBs : Antigène de l'hépatite B

ALAT : Alanine amino-transférase

APP : Ancien Protocole Prophylactique

ARN : Acide ribonucléique

ARV : Antirétroviraux

AZT : Zidovudine

AXSYM : Test immunoenzymatique (technologie MEIA).

CD4 : **Classe** de Différenciation.

CERBA-LaBioGene: Centre de Recherche Biomoléculaire Pietro Annigoni- Laboratoire de biologie et de génétique.

CNTS: Centre National de Transfusion Sanguine.

CNLS-IST : Conseil national de lutte contre le VIH/SIDA et les IST.

CRTS : Centre Régional de Transfusion sanguine.

CVP : Charge Virale Plasmatique.

DGV : Dépistage de génomes viraux.

D.O : Densité optique

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay.

Env : Enveloppe.

Gag : Groupe antigène.

Gp: Glycoprotéines.

HAART: Highly Active Antirétroviral Treatment.

HTLV : Virus responsable de la leucémie(Herpesviridae).

IgG: Immunoglobulines.

INVS : Institut national de veille sanitaire.

LAV : Lymphadénopathy Associated virus.

L T CD4 : Lymphocytes T CD4.

LTR: Long Terminal Repeat.

NVP : Névirapine.

RT/PCR : Reverse Transcriptase/Polymerase Chain Reaction.

PSL : Produits sanguins labile.

VHB : Virus de l'hépatite B.

VHC : Virus de l'hépatite C.

VIH/SIDA : Virus de l'Immunodéficience Humaine/ Syndrome de l'Immunodéficience Acquise.

QBD : Qualification biologique du don.

RESUME

Ces dernières années des progrès considérables ont été faits dans le but de garantir aux transfusés une sécurité maximale. Cependant un risque résiduel subsiste, celui de contracter une maladie virale par transfusion et ce, en dépit des mesures de sélection des donneurs. Le risque survient lorsque le donneur est en phase de séroconversion, période où les marqueurs biologiques de la pathologie virale sont indétectables par les méthodes de diagnostics sérologiques habituelles.

L'étude a porté sur une évaluation de la RT/PCR du VIH-1, sur des pools de plasmas provenant de donneurs de sang. Nous avons comparé la performance des tests combinés (Chaîne ELISA automatisé et semi-automatisée) de dépistage du VIH mis en place au CNTS de Ouagadougou. Trois types de tests de dépistages rapides (Determine, SD-Bioline et ImmunoComb) ont été également évalués. La présence d'autres infections virales ou bactériennes (VHB, VHC et syphilis) a été aussi recherchée et leur impact sur le processus transfusionnel. 151 sujets ont été inclus dans notre étude (sujets en phase de séroconversion ou en primo-infection). La majorité des donneurs était jeunes et de sexe masculin. Le sex-ratio était de 5,30.

Les donneurs ont été catégorisés en fonction du lieu du don : CRTS, SALARIES, SCOLAIRES, ARMEES, EGLISES et HORS. Les échantillons ont été analysés par ELISA lecteur de microplaque [70%(105/151)] ou par l'AXSYM (ELISA automatisé) [30% (47/151)]. Nous obtenons les résultats ci-après chez les donneurs non réguliers [n = 127 ; VIH+ = 82 % (68/83) ; VHB+ = 91 % (20/22) ; VHC+ = 75% (6/8) ; syphilis+ = 100% (1/1)] et les donneurs réguliers [n = 24 ; VIH+ = 18 % (15/83) ; VHB+ = 9 %(2/22) ; syphilis+ = 0 %]. Ces résultats montrent qu'il faut intensifier la sensibilisation des donneurs réguliers. Ceci par une politique d'information et d'éducation sur les autres pathologies transmissibles par transfusion sanguine.

Nous avons constitué 24 pools de 5 échantillons chacun et déroulé 6 pools positifs à la RT/PCR. Nous avons détecté par RT/PCR 5 échantillons négatifs au VIH-1 sur un total de 120 échantillons soit 4,16 %. Le diagnostic précoce par RT-PCR du VIH-1, nous a permis d'identifier clairement les donneurs infectés au VIH-1 et en phase d'incubation précoce. Ceci a l'avantage de réduire la fenêtre silencieuse d'incubation, et d'assurer à la fois un gain en poches de sang et une meilleure sécurité transfusionnelle. Nous obtenons là un gain certain en poche de sang si toute fois ces donneurs sont dépistés négatifs au VIH-2 et aux autres infections.

MOTS CLES : VIH — RT/PCR – CNTS – DONNEURS DE SANG.

SUMMURY

In recent years, considerable progress has been made to guarantee maximum transfusion security. However, a residual risk remains to contract a viral infection by transfusion, despite measures of screening donors. The risk occurs when donors are in the seroconversion period when biological markers of viral diseases are undetectable by routine serological methods of diagnosis

The study assessed HIV-1 detection by RT / PCR on pools of plasma from blood donors. We compared the performance of combined tests (ELISA automatic and semi automatic methods), routinely use in the screening of HIV at CNTS Ouagadougou. Three types of rapid test (Determine, SD-Bioline and Immunocomb) were also evaluated. The presence of other viral or bacterial infections (HBV, HCV and syphilis) was also searched and their impact on the transfusion process. 151 subjects were included in this study (subjects undergoing seroconversion or primary infection). The majority of donors were young and male. The sex ratio was 5.30.

Donors were categorized according to the place they were bled: CRTS, SALARIES, SCOLAIRES, ARMEES, EGLISES and HORS. Samples were analyzed by ELISA [70% (105/151)] or by AXSYM [30% (47/151)]. We obtained the following results in non-regular donors [n = 127, HIV + = 82% (68/83), HBV + = 91% (20/22) HCV + = 75% (6 / 8); syphilis + = 100 % (1 / 1)] and regular donors [n = 24, HIV + = 18% (15/83), HBV + = 9% (2 / 22); syphilis + = 0%]. These results showed that regular donors should be more sensitized for blood gift through information and education on other transmissible diseases which can be acquired by blood transfusion. We formed 24 pools of 5 samples each and tested individually samples from 6 pools positive by RT / PCR. We detected by RT / PCR 5 of 120 (4,16%) samples HIV-1 negative. HIV-1 early diagnosis by RT-PCR allowed us to clearly identify infected donors to HIV-1 in incubating stage. These have the advantage of reducing the silent window of HIV-1 incubation, and provide both an increase of number of blood bags qualified for transfusion and improved blood transfusion safety. This advantage of earning blood bags is valid in case donors are screened negative for HIV-2 and other infections.

KEY WORDS: HIV - RT / PCR - CNTS - BLOOD DONORS.

I-HISTORIQUE.

I.1 DECOUVERTE ET EMERGENCE DU VIH.

Le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) est une maladie infectieuse d'origine virale se traduisant par un déficit profond de l'immunité cellulaire. Il est dû au VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), un rétrovirus de la famille des Lentivirus dont 2 types ont été identifiés à ce jour. En 1983 L. MONTAGNIER, J.C. CHERMANN, et BARRE SINOUSI du département de rétro virologie de l'Institut Pasteur de Paris ont isolé le VIH-1. Puis en 1985, BARIN et collaborateurs ont montré qu'un autre rétrovirus humain apparenté au VIH-1 circulait en Afrique de l'Ouest (BARIN *et al.*, 1987). Il s'agissait du VIH-2 qui n'a pas connu un développement mondial même si des cas sporadiques ont été signalés de par le monde. Les modes de transmissions de ces 2 types de VIH sont semblables, cependant le VIH-2 est cinq fois moins transmissible et moins pathogène que le VIH-1 et ce lorsque le transmetteur est asymptomatique (GIRARD *et al.*, 2001).

Le sida a émergé à la fin des années 1970 début des années 1980. C'est en mai 1983 lors d'une publication dans la revue Science que pour la première fois le virus du sida fut décrit, à l'époque l'équipe de l'institut pasteur l'avait appelé <<Lymphadénopathy Associated virus >> ou LAV. Le lien de causalité entre ce virus et le sida restait encore en effet à démontrer.

En fin 1983 donc, la preuve fut faite. Le LAV (future VIH dans la nomenclature), rétrovirus humain était bien l'agent causal du sida. En janvier 1985, paraît dans *Cell* un article sur le séquençage du virus LAV. Dans la même année diagnostic pasteur à la suite des travaux effectués par les équipes pasteurienne, mettra au point un premier test de dépistage du VIH-1 Elavia (*Institut pasteur, découverte du sida en 1983*).

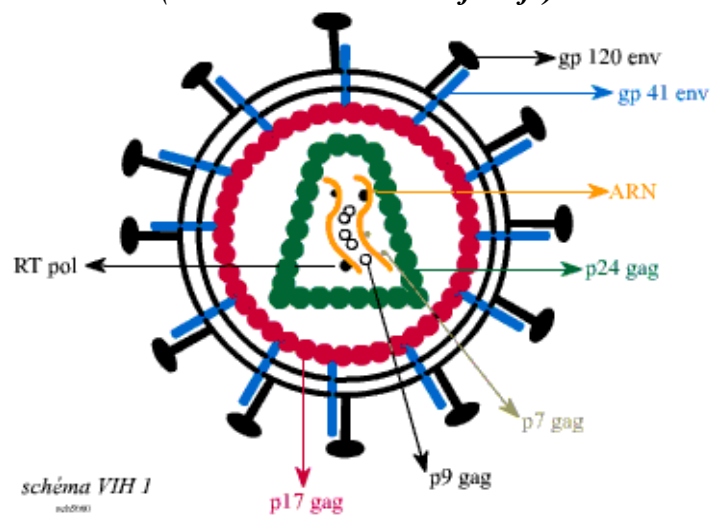
Le VIH-1 a été isolé en 1983 pour la première fois. Le VIH-2 a été identifié en 1985 chez des patients d'Afrique de l'ouest souffrant de sida. Une particularité du VIH est sa grande variabilité génétique. Deux groupes caractérisent le VIH-1 : le groupe << Major >>(M) divisé en 10 sous types de A à J et le groupe << Outiller >>(O).trois sous- types sont caractéristiques de certains continents. Le sous-type A est principalement trouvé en Afrique, le B en Europe et aux Etats-Unis d'Amérique, et le sous-type E en Asie, plus précisément en Thaïlande .Le VIH-2 endémique en Afrique de l'ouest, comprend cinq sous-types allant de A à E. On ne maîtrise pas bien les problèmes de transmissibilité et de pathogénéicité que pose cette variabilité génétique du VIH. Celle-ci pose de manière certaine des problèmes de diagnostic et thérapeutique. A ce jour, c'est la variabilité génétique du VIH qui obscurcit le plus l'horizon de la découverte d'un vaccin universel (SANOU, 1999).

I.2 BIOLOGIE DU VIRUS DU SIDA.

I.2.1 GENOME ET PROPRIETES STRUCTURALES DU VIH-1.

Le VIH-1 appartient à une famille importante de virus qui, de façon caractéristique sont associés à des maladies immunosuppressives (qui affaiblissent le système immunitaire) ou à des maladies du système nerveux avec de longues périodes d'incubation (où il ne se passe rien) suivant l'infection première avant que des maladies secondaires deviennent apparentes selon Tremblay, Infectiologie et Biologie du VIH-1. <http://cri.crchul.ulaval.ca/uhiv/>.

Figure 1 : Schéma du VIH-1
(Source anne.decoستر.free.fr).

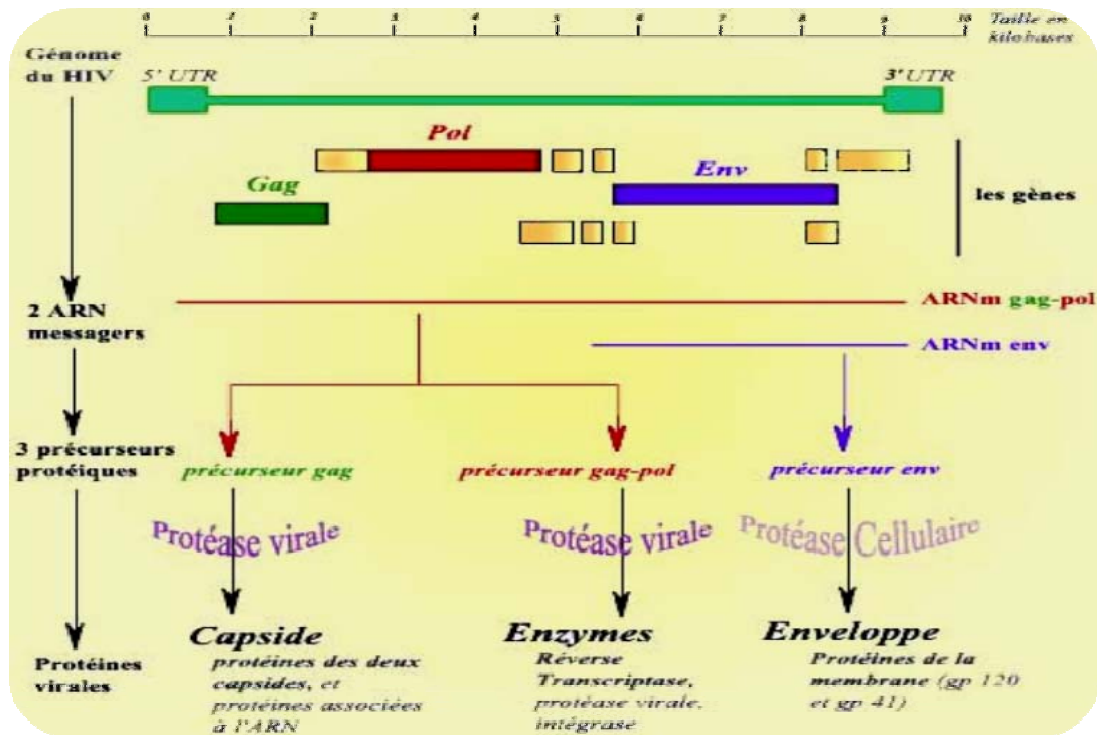


La structure du VIH comprend de l'intérieur vers l'extérieur (figure2) :

- Une enveloppe constituée de glycoprotéines gp120, gp41 et d'une double couche de phospholipides;
- Une matrice formée de glycoprotéines gp17;
- Une capsid 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 capsid, 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 créés lorsque la transcriptase reverse synthétise l'ADN proviral.

Figure 2 : Gènes de structures du VIH-1/2
 (Source Gilles Fureland et Benjamin Pavie/le virus du SIDA).

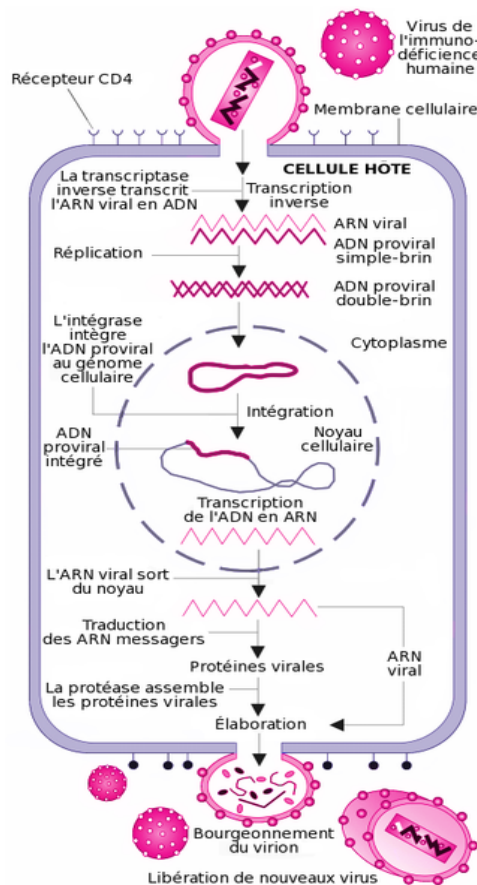


I.2.2 INFECTIOSITE DU VIH ET ASPECTS IMMUNOLOGIQUES.

Le VIH infecte les cellules qui expriment à leurs surfaces une molécule particulière appelé récepteur CD4. Le récepteur CD4 présente une haute affinité pour la molécule gp120. Dans le mécanisme de l'infection le virus se lie à celle-ci grâce à la 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 *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2009).

Le virus du SIDA s'attaque préférentiellement aux cellules T CD4 même s'il peut s'attaquer à d'autres types de cellules comme les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques (THEZE ,2008). Pendant l'infection le nombre de cellules possédant le récepteur CD4 chute progressivement et cette réduction indique la phase SIDA de la maladie (immunodéficience profonde). La mesure du taux de CD4 pendant la maladie sert à indiquer la gravité de l'infection (FRIPPIAT *et al.*, 1999 ; HU *et al.*, 2001).

Figure 3 : Cycle de réplication du VIH.
www.wikipedia.fr



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). 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.

Les deux capsides se dissocient, libérant l'ARN viral dans le cytoplasme. Grâce à la réverse 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.

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. Les protéines virales et l'ARN viral sont associés pour former de nouvelles particules virales infectieuses. Les protéines virales membranaires sont intégrées à la membrane du lymphocyte. Le virus bourgeonne, emportant un fragment de la membrane plasmique du lymphocyte sur laquelle sont intégrées les protéines membranaires

virales. Les nouveaux virus sont libérés dans le milieu intérieur. Ils peuvent infecter de nouveaux lymphocytes T4.

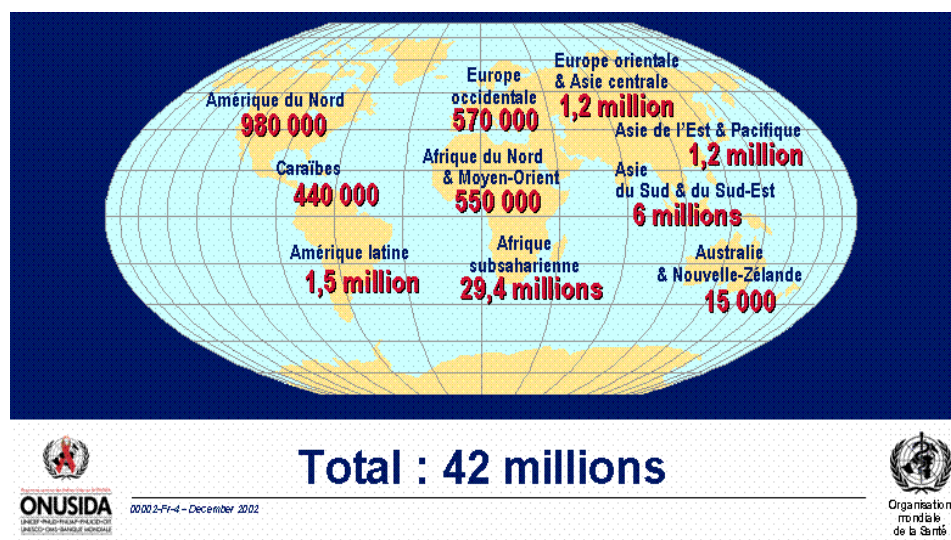
I.2.2.1 REACTION IMMUNITAIRE DE L'HOTE FACE A L'INFECTION.

Après la contamination le virus est détectable sous sa forme d'acide ribonucléique (ARN) dès le 10-12^e et sous sa forme d'antigène P24 représentant juste une fraction du virus, vers le 12-14^e jour. Les premiers anticorps sont détectables dès le 21^e jour. La cinétique d'apparition des anticorps anti-VIH varie en fonction de chaque patient et aussi de la souche infectante. L'hôte infecté peut réagir soit par l'immunité non spécifique, constituée de barrières naturelles à l'infection comme la phagocytose par les neutrophiles et les macrophages. Soit également par l'immunité spécifique à travers l'immunité cellulaire assurée par les lymphocytes T ; et de l'immunité humorale assurée par les lymphocytes B.

I.3 SITUATION MONDIALE DE L'ÉPIDÉMIE A VIH.

Selon l'ONUSIDA le nombre de personnes vivant avec le VIH /SIDA dans le monde est estimé à plus de 33,2 millions (30,6 -36,1 millions).L' Afrique subsaharienne paye le plus lourd tribut avec plus de 22,5 millions de contaminés. Le SIDA a causé dans cette région d'Afrique plus de 1,6 millions de décès en 2007 avec 1,7 millions de nouveaux cas. Le nombre de décès dû au Sida en 2006 dans le monde était de 2,1 millions (1,9 -2,4 millions), dont 1,7 millions d'adultes et 380 000 enfants de moins de 15 ans.

Figure 4 : Situation mondiale de l'épidémie à VIH/SIDA (ONUSIDA/OMS décembre 2002).



I.3.1 ÉPIDEMIOLOGIE DU VIH/SIDA ET DES IST AU BURKINA FASO.

Au Burkina Faso le SIDA est une préoccupation nationale et dès 1986 un comité national de lutte contre le SIDA(CNLS) à été mis en place pour combattre l'expansion de l'épidémie à VIH au sein de la population. En fin 1998, le Burkina Faso a notifié 13.518 cas de SIDA. En raison du faible accès aux services de santé, des difficultés de diagnostic et de la sous-notification générale, ces cas de SIDA reflètent mal l'ampleur de l'épidémie à VIH dans le pays (SANOU, 1999).

Selon le rapport ONUSIDA 2008, la prévalence moyenne de l'infection à VIH dans la population adulte burkinabé était de 1,6% en fin 2007, dans un intervalle (1,4-1,9), estimation faite à partir des logiciels EPP (Epidemiologic Projection Package) et le Spectrum recommandés par l'OMS et l'ONUSIDA et utilisé par la plupart des pays.

Les autres données se présentent comme suit :

- 130 000 personnes vivant avec le VIH,
- 120 000 adultes vivant avec le VIH, dont 61 000 sont des femmes,
- 9 000 décès dus au SIDA
- 100 000 enfants estimés orphelins du fait du SIDA en 2007 au Burkina Faso.

Toujours selon ce rapport, les données indiquent un changement en faveur de comportement propres à limiter la propagation du VIH .Le recours au préservatif au cours des rapports sexuels avec un partenaire occasionnel a beaucoup augmenté chez les femmes passant de 39% à 53% entre 1998-1999 et 2003.

Tableau I: Cas de VIH par tranche d'âge en 2007 comparées aux données de 2008

(Source PNM 2008 du CNLS-IST, 2008).

Tranche d'âge	2006		2007	
	Cas	%	Cas	%
Moins d'1 an	41	0,8	44	0,7
1-4 ans	51	1	73	1,0
5-14 ans	58	1,1	91	1,3
15 ans et plus	4994	97,1	6804	97,0
Total	5144	100	7012	100

Parmi les 6804 cas adultes enregistrés en 2007, on dénombre 2283 hommes et 4521 femmes soit respectivement 33,55% et 66,45% des cas. Le sexe ratio est de 0,5 (2283/4521). Il faut noter également que la prévalence du VIH présente des disparités selon les tranches d'âge. En effet, la tranche d'âge 25-29 ans présente la prévalence la plus élevée tandis qu'entre 45 et 49 ans la prévalence deviennent nulle. Par ailleurs, toutes les tranches d'âge à l'exception des 15-19 ans et des 40- 49 ans enregistrent des prévalences supérieures à la moyenne nationale qui est 2,3%.

I.3.2 MODES DE TRANSMISSIONS ET TRAITEMENTS.

I.3.2.1 TRANSMISSIONS.

Il existe trois modes de transmission du VIH :

- la transmission sexuelle, par contact entre les muqueuses vaginale, rectale, buccale et les sécrétions sexuelles ou du sang contaminé.
- la transmission par voie sanguine, par partage de matériel d'injection de drogues contaminé, lors d'accidents d'exposition au sang ou par transfusion de sang contaminé (le risque résiduel de contamination par transfusion sanguine est actuellement estimé à 0,3 pour 100) :

- la transmission materno-fœtale in utero par passage transplacentaire, pendant l'accouchement par exposition au sang et aux sécrétions vaginales ou ingestion de sécrétions ou après la naissance par allaitement maternel.

I.4 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 *et 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 (Sumner *et al.*, 2004; Chaplain *et 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 VIH2 et le groupe O du VIH1. 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 un inhibiteur de protéase (Garrait, 2001).

I.4 DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES INFECTIONS A VIH.

Le diagnostic des infections à VIH repose, chez l'adulte, sur la détection des anticorps. L'infection par le VIH entraîne une réponse immunitaire qui fait apparaître des anticorps dirigés contre toutes les protéines virales. La présence d'anticorps anti VIH est le témoin de l'infection: un individu qui les possède est déclaré séropositif (RAFFI, 1999).

I.4.1 PRINCIPE DES TESTS DE DEPISTAGE.

Le dépistage des anticorps anti-VIH-1 et anti-VIH-2 s'effectuent le plus souvent par des tests dits ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) ou par des tests simples /rapides utilisant comme antigène des lysats viraux ou des protéines recombinantes ou synthétiques. Ces protéines correspondent aux épitopes immuno-dominants des deux virus, VIH-1 et VIH-2. Ces tests mixtes (4^{ème} génération) sont capables de dépister les anticorps anti-VIH-1 et anti-VIH-2. Actuellement deux types de tests ELISA sont utilisés pour le dépistage :

• Il s'agit des tests ELISA "sandwich" :

La révélation de la réaction entre antigènes de la trousse (kit) et les anticorps anti-VIH du patient se fait par un antigène marqué, se fixant sur les sites anticorps restés libres. Ce sont les tests les plus sensibles pour la détection des anticorps anti-VIH et la spécificité est également excellente. Ils sont les plus utilisés dans le cadre du dépistage des dons du sang. Ces tests ELISA sandwich peuvent être utilisés aussi pour la détection en plus des anticorps présents chez le patient, d'une fraction du virus appelé antigène p24 lorsque cette fraction est présente dans le plasma (test combiné). Cela est particulièrement intéressant lors des premiers jours de la primo-infection quand seule cette fraction antigène p24 peut être détectée par les tests sérologiques.

•Les tests ELISA "indirects"

La fixation des anticorps du patient sur les antigènes de la trousse est révélée par une anti-globuline humaine anti-IgG marquée par une enzyme. Ce sont des tests robustes peu sensibles aux variations antigéniques du VIH. Ils manquent de sensibilité lors de la primo-infection et leur spécificité est médiocre (nombreux résultats faussement positifs).

•les tests simples/rapides.

Ce sont le plus souvent des tests dits par immunochromatographie, avec une filtration ou une migration du sérum sur une membrane ou un support recouvert d'antigènes recombinants

VIH-1 et VIH-2. Lors de cette filtration ou migration, les anticorps anti-VIH, s'ils sont présents dans l'échantillon, se fixeront sur les antigènes présents sur le support. La révélation de cette liaison antigène-anticorps se fait généralement par un conjugué. Le test se réalise en une dizaine de minutes en général de façon unitaire. Cette simplicité d'emploi leur assure une large diffusion dans les pays en voie de développement. Pour l'ensemble de ces tests, l'absence de résultats quantifiés et enregistrés sur un support papier est un obstacle à la traçabilité des manipulations.

•Tests de confirmation.

Il s'agit essentiellement du Western Blot (WB) et des immunoblots utilisant des protéines de synthèse :

➤ La technique du Western Blot (WB) est une méthode de référence (PLANTIER *et al.*, 2002; KLIMKAIT. *et al.*, 2008). Mais son interprétation peut être délicate. Le WB, consiste à un transfert sur nitrocellulose, après migration électrophorétique en gel de polyacrylamide, de protéines d'un lysat viral VIH-1 ou VIH-2.

Sur la bandelette de WB, différentes protéines constitutives 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 systématique dans tous les pays, y compris dans les pays industrialisés. Il porte, en toute rigueur sur un second prélèvement sérique, pour se mettre à l'abri d'une éventuelle erreur d'étiquetage du premier prélèvement. Il permet parfois d'évoquer une séroconversion récente ou une infection par des variants lors de profils incomplets. En cas d'infection à VIH, le WB sera le plus souvent pleinement réactif et donnera peu d'information complémentaire. Inversement, en cas de "non infection", des réactivités non spécifiques sont fréquentes et d'interprétation difficile. Aussi, des alternatives au WB sont nécessaires pour éviter un recours systématique à cet examen coûteux et pas toujours très informatif.

➤ Les immunoblots utilisant des protéines de synthèse sont des tests de commercialisation, récente et d'un coût élevé par rapport au WB. C'est une disposition de différentes protéines recombinantes ou peptides de synthèse présentée sur bandelette ou sur support plastique. Ces tests ne sont qu'une présentation sur un format différent des antigènes utilisés lors des examens de dépistage et ils n'apportent ainsi aucune information complémentaire.

- **Tests disponibles.**

La sélection des tests de dépistages dans les pays est fortement dépendants des réseaux locaux de distribution et de stockage (société de distribution de matériels biomédicales). Dans tout les cas on doit exiger pour choisir des tests, les critères suivants :

- Une sensibilité et une spécificité maximale, en accord avec les recommandations de l'ONUSIDA et de l'Organisation Mondiale de la santé (OMS), à savoir une sensibilité $\geq 99,5\%$ et une spécificité $\geq 99\%$,
- Des réactifs couvrant au mieux la diversité du VIH (utilisation d'antigènes recombinants ou de peptides VIH-1 et VIH-2 voire de VIH-1 du groupe O).
- Pour les tests ELISA, une compatibilité avec toutes les chaînes "microplaques".
- Pour les tests simples / rapides, la capacité de différencier VIH-1 et VIH-2.
- Enfin, il faut pouvoir disposer facilement d'au moins trois tests différents pour effectuer les stratégies alternatives.

I.4.4 STRATEGIES ALTERNATIVES POUR LA CONFIRMATION DES INFECTIONS A VIH.

Deux points sont fondamentaux lors d'une démarche de dépistage et de confirmation :

- l'examen de confirmation, quelle que soit la technique ou la stratégie choisie, se fera exclusivement sur un prélèvement sanguin différent de celui sur lequel le dépistage a été réalisé. En effet, des erreurs involontaires d'identification des prélèvements, voire volontaires, sont possibles. Enfin, les contaminations de sérum sont fréquentes, et ce d'autant plus qu'un grand nombre de prélèvement positif est manipulé comme dans les laboratoires des régions de fortes prévalences au VIH.
- lorsqu'un test de dépistage est positif et que le test de confirmation est négatif, on ne peut pas conclure à la non-infection et un suivi du patient est obligatoire. En cas de persistance d'une discordance (dépistage positif et confirmation négative) au-delà d'un mois de suivi et en l'absence de facteur de risque VIH ou de suspicion d'infection par un variant, le patient peut être considéré comme faussement réactif au dépistage. il faut savoir imposer un suivi long, d'au moins six mois en cas de discordance entre les tests de

dépistage/confirmation, avant de conclure à une séronégativité. On regroupe sous le terme de stratégies alternatives l'ensemble des combinaisons de tests qui permettent, dans une situation épidémiologique et clinique donnée, de porter le diagnostic d'infection ou de "non infection" à VIH. Le diagnostic d'infection ou de "non infection" à VIH. Ces stratégies reposent sur la détection des anticorps et ont pour objectif d'obtenir des valeurs prédictives ou négatives égales à celles de la stratégie classique utilisant le WB comme test de confirmation.

I.4.4 CHOIX D'UNE STRATEGIE.

Le choix d'une bonne stratégie repose sur :

- L'objectif du dépistage.
- La sensibilité et la spécificité des tests.
- La prévalence de l'infection à VIH dans les populations testée.

Trois stratégies adaptées de l'OMS pour détecter les anticorps dans les échantillons de sérum ou de plasma (Extrait du relevé épidémiologique hebdomadaire du 21 mars 1997 de l'OMS) sont présentées ci-après :

➤ Stratégie I

Les échantillons sont testés par ELISA ou par une méthode simple/ rapide. En cas de réaction positive, le sérum est considéré comme positif pour les anticorps anti-VIH. En l'absence de réaction, le sérum est considéré comme négatif. En transfusion sanguine, il convient de choisir le test le plus sensible. Si le résultat est positif, le don de sang doit être éliminé selon les mesures de précaution universelles. Cela étant, pour poser un diagnostic et rendre un résultat à un donneur de sang ou à un patient, il faut le plus souvent utiliser les stratégies II ou III.

➤ Stratégie II

Tous les échantillons de sérum/ plasma sont d'abord soumis à un ELISA ou à un test simple/rapide. Un sérum qui ne réagit pas au premier test (test A) est considéré comme négatif. Si un sérum réagit au 1^e test, un second prélèvement doit être réalisé chez le patient, le nouveau sérum doit être analysé avec un 2^e test (test B) ELISA ou un test simple/rapide, utilisant une préparation antigénique différente et/ou un principe différent (Par exemple,

méthode indirecte et méthode sandwich ou test simple/rapide). Si les deux tests A et B sont positifs, le porteur est considéré comme positif pour les anticorps anti-VIH. Si les résultats des deux tests A et B demeurent discordants, le sérum est considéré comme indéterminé.

➤ **Stratégie III**

Si le test A de dépistage est négatif, le sérum est déclaré négatif. En cas de positivité du test A, comme pour la stratégie II, un nouveau prélèvement est réalisé. Si le sérum réagit au 2^e test B, la stratégie III fait appel à un 3^e test (test C). Les trois tests employés dans cette stratégie doivent utiliser des préparations antigéniques différentes et / ou reposer sur des principes différents. Un sérum qui réagit dans les trois tests est considéré comme positif pour les anticorps anti-VIH. Un sérum donnant un résultat discordant entre les tests est considéré comme indéterminé.

➤ **Indications des stratégies I, II et III.**

La stratégie I ne peut être utilisée que pour confirmer le diagnostic clinique du SIDA chez des personnes dont le cas correspond aux critères cliniques de l'OMS, et cela, à condition que la prévalence du VIH dans la population dépasse 30 %. C'est la stratégie II qu'il faut utiliser dans les populations où la prévalence est moindre pour un diagnostic chez des personnes présentant les signes cliniques d'immunodépression.

Pour les stratégies II et III, le premier test de recherche des anticorps anti-VIH doit avoir la sensibilité la plus élevée possible, alors que les deuxième et troisième tests doivent avoir une spécificité plus élevée que le premier.

Tableau II : Indications des stratégies alternatives
(Source Développement et santé, n° 162, décembre 2002).

objectif	Prévalence	Stratégie
Sécurité transfusionnelle		I
Surveillance épidémiologique	>10%	I
	< 10%	II
Diagnostic quand symptômes du VIH	>30%	I
	<30%	II
Diagnostic quand asymptomatique		III

I.4.4 UTILISATION ET FIABILITE DES TESTS RAPIDES (TDR).

Ce sont des tests de dépistages unitaires qui permettent la détection des anticorps anti-VIH-1 et anti-VIH-2. Le principe des tests de détection rapides est fondé sur des techniques ELISA. Ces tests sont capables de dépister à partir d'un sérum ou d'un plasma humain, les anticorps anti-VIH1 et anti-VIH-2 (MAIGA *et al.*, 1992) :

- Antigène viral fixé sur un support.
- Capture des anticorps présent dans le sang (plasma, sérum, sang total, ou dans la salive).
- Basé sur un principe d'immuno-filtration ou immuno-chromatographie
- Révélation du complexe antigène-anticorps par un système à réaction colorée (positive).

Ils existent différents types de supports godet, carton, bandelette. En France les TDR sont utilisés pour le dépistage classique, associé à un ELISA ou dans les cas d'urgence : Greffes d'organes (donneurs), AÉV, Accouchement (grossesses non suivies) (TAMALET, 2009).

Pour résumer les tests rapides sont pratiqués à partir de micro-prélèvements de sang veineux (pique au bout du doigt, au talon des nouveaux nés). Ils sont techniquement très faciles à réaliser et le résultat rapide est obtenu au bout de 10 à 40 minutes. Ce sont des tests

qui ne sont pas adaptés aux très grandes séries, non automatisés à résultats qualitatifs : positif ou négatif (algorithme actuel nécessite un test de confirmation).

- **Recommandations pour l'utilisation des tests rapides.**

Il faut d'abord l'organisation d'une paillasse avec petit matériel, le respect des normes d'hygiène et sécurité, la formation des opérateurs :

- Au prélèvement et à la technique.
- A la lecture des résultats.

Une organisation de l'enregistrement des échantillons et des résultats (confidentialité). Ainsi que l'archivage et la traçabilité (photocopie, papier, scanner...).

I.5 LA TRANSFUSION SANGUINE.

Ces dernières années des progrès considérables sont faits pour améliorer la qualité des produits sanguins labiles obtenus dans le processus de transfusion sanguine. En Afrique, ces améliorations se traduisent non seulement par l'introduction du dépistage sérologique systématique des virus du SIDA (VIH-1 et VIH-2) et des hépatites B et C sur les dons de sang, mais aussi par la recherche de la garantie d'une sécurité maximale en transfusion sanguine qui repose sur des bases suivantes :

- ♦ L'organisation des structures, des établissements de transfusion sanguine.
- ♦ L'hémovigilance, qui constitue un système de recueil des données, d'analyses et d'actions d'amélioration.
- ♦ Les bonnes pratiques transfusionnelles à appliquer de manière pragmatique.
- ♦ La formation des acteurs impliqués dans la chaîne transfusionnelle.
- ♦ Le développement des activités de référence et de recherches etc.

De nos jours, le risque de contamination par transfusion du virus du SIDA comme des virus des hépatites B (VHB) et C (VHC) a considérablement diminué grâce à l'application des mesures préventives et à l'amélioration de la sensibilité des réactifs de dépistage sérologique. Cependant, il subsiste un risque résiduel, très faible, mais qui persiste et ce, en dépit des mesures de sélection des donneurs et du dépistage des marqueurs biologiques. Ce risque

résiduel post-transfusionnel est essentiellement lié à la fenêtre sérologique, période qui sépare l'infection de l'apparition des marqueurs sérologiques (anti-VIH, anti-VHC et VHB etc.).

La sécurité transfusionnelle reste un problème de santé publique majeur dans le monde et demeure un élément clé de la lutte contre le VIH. D'ici 2010, l'Onusida estime à 45 millions le nombre de nouvelles contaminations par le VIH si rien ne vient contrer l'expansion de l'épidémie. Parmi ces nouveaux cas, 4 millions seront imputables à des transfusions sanguines ou d'autres injections médicales. Aujourd'hui encore la transmission du VIH par cette voie- là est toujours d'actualité pour la majorité des habitants de la planète.

Chaque année selon l'OMS, 80 millions d'unité de sang sont recueillies dans le monde, or 38 % seulement le sont dans les pays en voie de développement où vit la quasi-totalité de la population mondiale. Et c'est justement dans ces pays en voie de développement que l'épidémie à VIH est la plus importante matérialisé par des taux de prévalence les plus élevés, pour le Burkina Faso l'Onusida estime à 2 % en 2006 la prévalence du VIH sida.

A cela s'ajoute l'émergence de nouveaux variants viraux qui peuvent s'avérer difficile voir même impossible à détecter par les tests dont disposent les unités de soins transfusionnelles. Récemment l'équipe du Professeur Plantier, du CHU de Rouen a mis en évidence un nouveau variant du VIH-1 du groupe P proche d'un virus identifié chez les gorilles (SIVgor) chez une femme d'origine camerounaise. Ce nouveau variant se distingue des trois groupes déjà répertoriés (M, N, O). Il a été admis que l'origine de ce nouveau groupe P est probablement liée à un passage de virus SIV du gorille à l'Homme comme cela a été décrit dans le cas des VIH-1 de groupe M et N à partir de contamination par manipulation de viande de chimpanzés infectés.

I.5.1 RISQUES TRANSFUSIONNELLES.

La transmission sanguine du VIH se fait essentiellement par le contact avec le sang contaminé ce qui inclut la transfusion sanguine, les accidents d'exposition au sang, la toxicomanie par voie veineuse etc.

Au début de l'épidémie le taux de transmission par transfusion sanguine était très élevé pratiquement 100%. L'application actuelle des mesures préventives dans les pays développés a réduit le risque et en France en 2005 le risque de contracter le VIH par transfusion était inférieure à 1/1000 000 de dons (BOUVET et *al.*, 2005).

En Afrique, les fortes prévalences au VIH font que ce risque est encore plus important et est sous estimé, car il existe peu ou pas de suivi des patients transfusés. Les dons de sang le plus souvent vont au bénéfice des femmes (péripartum) et des enfants (cas de paludisme). Selon BOUVET *et al.*, 2005 le sang contaminé par le VIH en Afrique est responsable de 5% à 10% des nouvelles contaminations. Le manque de coordination des services de transfusion sanguine dans plus de la moitié des pays Africains en est une des causes (KABA, 2004). Egalement font partie de ces causes, le fait que les tests de dépistage sérologique de maladies virales ne sont pas généralisés, la disponibilité du sang : la conservation, le recrutement de donneurs volontaires et bénévoles. L'OMS prévoit pour l'horizon 2012 les objectifs suivants sur les dons de sang en Afrique :

- L'analyse de la sécurité transfusionnelle par tous les états.
- Un nombre supérieur ou égal à 75% des pays auront au moins formulé leur politique des sécurités transfusionnelles.
- 100% des poches testées.
- 80% des donneurs seront volontaires et réguliers.

La sécurité vis-à-vis des maladies transmissibles par les produits sanguins labiles est une préoccupation permanente dans beaucoup de pays. Quatre mesures ont été adoptées dans les pays développés comme la France en vue de réduire le risque de transmission des virus majeurs (VIH-1/2, VHB, VHC, et des leucémies). La première mesure repose sur une sélection clinique rigoureuse des candidats au don de sang au cours de l'entretien médical. La seconde est l'introduction progressive de nouveaux tests de dépistages dans la qualification biologique du don (QBD), qui a contribué à réduire le risque résiduel de façon significative (COUROUCE *et al.*, 1997, SCHREIBER *et al.*, 2000). Ensuite la recherche d'un taux augmenté de transaminases (ALAT), marqueur indirect d'hépatite virale rendue obligatoire en France le 15 avril 1998 (COSTE, revue médicale suisse n°2344).

Et enfin l'introduction de la déleucocytation systématique des dérivés sanguins, ce qui a permis d'éliminer le risque de transmission des virus leucotropes, tels que ceux appartenant à la famille des Herpesviridae et des HTLV.

I.5.2 LE RISQUE RESIDUEL.

Selon l'INVS (*Institut Nationale de Veille Sanitaire*), le risque résiduel est le risque de transmission d'un virus lors d'une transfusion, et ce en dépit des mesures de sélection des donneurs et du dépistage des marqueurs biologiques de l'infection virale. Il est représenté quasi exclusivement par des dons infectieux, collectés pendant la fenêtre de silence sérologique, laquelle correspond à la période comprise entre le comptage et l'apparition du marqueur sérologique (antigène ou anticorps) recherchés dans les dons de sang.

La durée de la fenêtre sérologique est de 56 jours pour le VHB, de 66 jours pour le VHC, et de 22 jours pour le VIH-1. Le risque résiduel peut survenir dans d'autres situations comme l'existence de donneurs dits immuno-silencieux, qui sont infectés par le VHC, mais ne produisent pas d'anticorps anti-VHC, ou bien de façon très retardée par rapport au schéma classique jusqu'à 28 mois comme c'est le cas chez un donneur de sang découvert en France (DURAND, DANIC, TARDIVEL *et al.*, 2000) ; ensuite l'existence de variants viraux dont les marqueurs ne seraient pas détectés par les tests de dépistages utilisés en routine, et la survenue d'une erreur de laboratoire conduisant à rendre un résultat négatif pour un don en réalité positif (BUSCH *et al.*, 2000).

Ce risque est estimé depuis 1994 à partir d'un modèle mathématique établi par SCHREIBER *et al.*, 1994 qui tient compte du taux d'incidence de chaque infection chez les donneurs de sang, ainsi que la durée de fenêtre sérologique.

***Risque résiduel = Taux d'incidence/durée de la fenêtre silencieuse**

Sur la période 1997-1999, ce risque pour le VIH-1 était de 1/1 750 000 dons. Ainsi sur la base d'un effectif de 2,5 millions de dons collectés en France en 1998 le nombre de dons qui échapperait aux tests de dépistages sérologiques, serait de 1,5 pour le VIH-1 ; 3,6 pour le VHC et 5,5 pour le VHB soit un total de 10 dons tous virus confondus. Il est également ressorti que le risque clinique pour le receveur de produits sanguins labiles (PSL) de contracter une infection sévère est plus important pour le VIH-1 et le VHC que pour l'hépatite B.

Pendant la période de séroconversion certains accidents sérologiques peuvent survenir, ainsi d'après NUBLING *et al.*, 1995, le constat d'une transmission du virus de l'hépatite C (VHC) par des immunoglobulines intraveineuses a conduit l'Institut allemand Paul Erlich à recommander le dépistage de l'ARN du VHC dans des pools de plasma destinés au

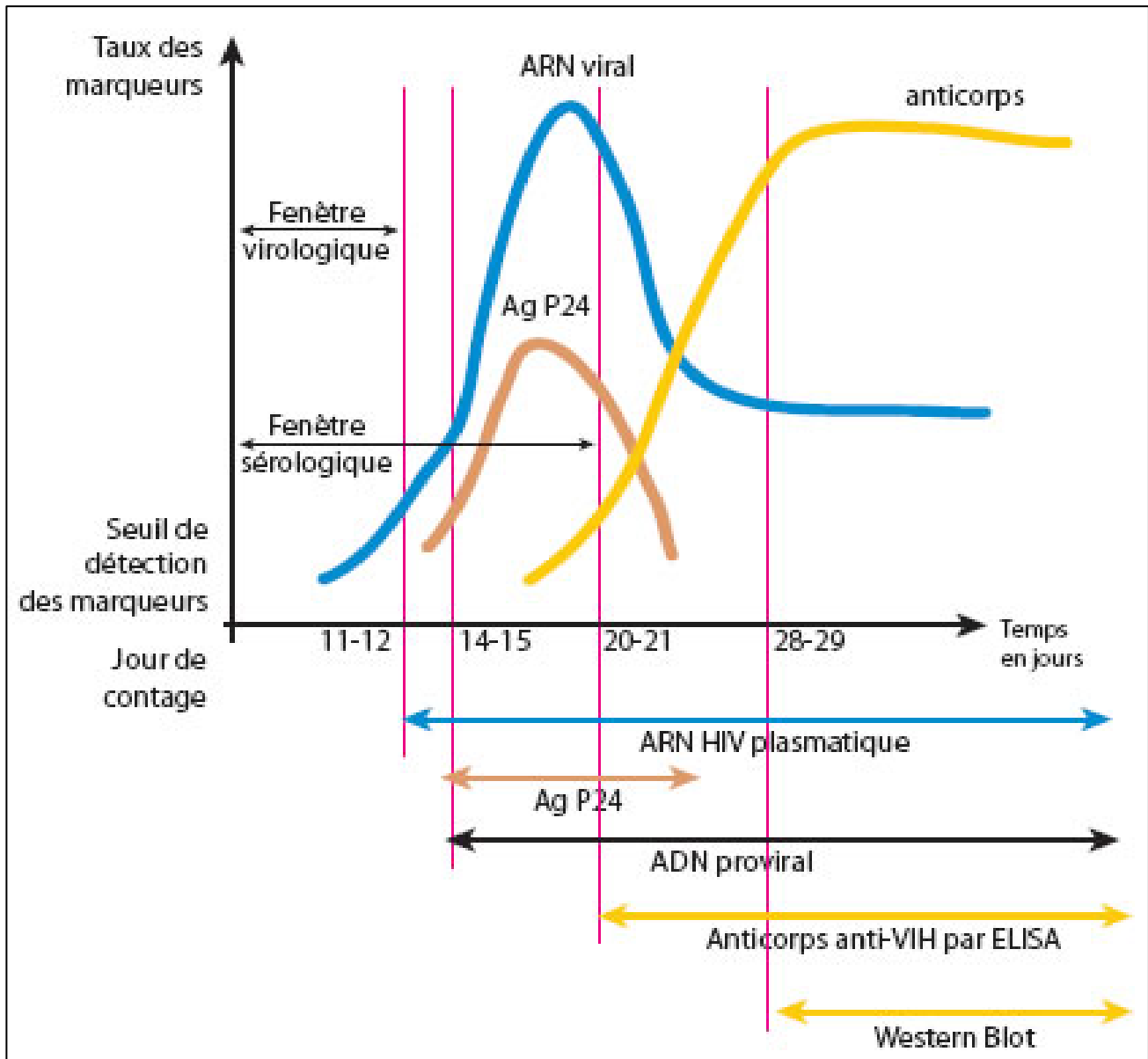
fractionnement de ces immunoglobulines. Ce qui avait déjà soulevé à l'époque la question de la pertinence du dépistage de génomes viraux (DGV) sur les dons de sang pour renforcer la sécurité transfusionnelle des PSL.

I.6 BIOLOGIE MOLECULAIRE ET SECURITE TRANSFUSIONNELLE.

C'est la description en 1985 de la polymérase chain reaction (PCR) par K.B.MULLIS qui a permis d'appliquer les techniques biomoléculaires à de nombreux domaines de la biologie clinique. Ce sont des techniques puissantes qui ont émergées dans les années 1970 dans les laboratoires de recherches. Leurs intérêts réside dans l'extraordinaire capacité qu'elles ont d'amplifier dans un temps très court, un million voire même un milliard de fois une séquence d'acide nucléique viral dont on ne disposait au départ que d'une infime quantité ; ce qui permet ensuite de les détecter par les procédés courants de biologie moléculaire.

En transfusion sanguine, le DGV ,a permis de réduire d'une manière conséquente la fenêtre sérologique environ 90% pour le VHC,50% pour le VIH et 45% pour le VHB (COSTE, revue médicale suisse n°2344). Le nombre de dons supplémentaire dépister par le DGV serait d'environ 60% par rapport aux tests de sérologie virale .Selon SCHREIBER et *al.*, 1995 la fenêtre sérologique peut être divisé en deux phases : <<l'éclipse >>comprise entre la contamination et l'apparition de l'ARN viral, au cours de laquelle la réplication virale peut être mise en évidence dans la cellule hôte mais non dans la circulation générale. Et la phase "virémique", comprise entre l'apparition du marqueur moléculaire et du marqueur sérologique ; au cours de laquelle le génome viral devient détectable. On a ainsi pu préciser les charges virales pendant la phase virémique, pour le VIH les charges virales détectées vont de 10^2 à 10^7 copies/ml et le temps de dédoublement est d'un jour environ. La faisabilité du DGV en analyse de routine a été démontrée (COSTE et *al.*, 2000) et en 2000, une étude a permis de démontrer l'absence de contamination des laboratoires par les produits d'amplification et ce malgré l'utilisation à grande échelle des techniques de biologie moléculaire (CORNILLOT et *al.*, 2000).

Figure 5: Cinétique d'apparition des anticorps anti-VIH-1
(Source www.ccr.fr/sites/vih/fr/diagnostic.htm.)



II-DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DU VIH
PAR RT/PCR.

II.1 LA REACTION DE LA 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 *et 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. La réaction en chaîne de la polymérase (PCR) est une technique puissante, révolutionnaire, largement répandue et qui est utilisée pour amplifier l'ADN et produire in vitro de grandes quantités d'une séquence d'acides nucléiques.

II.1.1 LES ETAPES DE LA PCR.

Pour faire la PCR, on utilise l'ADN polymérase d'une bactérie : Thermophile aquatique qui vit à 75°C dans les eaux thermales. Cette polymérase (Taq polymérase) est toujours active à 94-96°C. La réaction de la PCR comporte trois étapes qui constituent un cycle au cours duquel la quantité d'ADN à amplifier est doublée. Ces cycles sont renouvelés entre 20 et 50 fois en fonction de la quantité d'ADN initial de départ et du but recherché. C'est une succession d'étapes qui consistent à une :

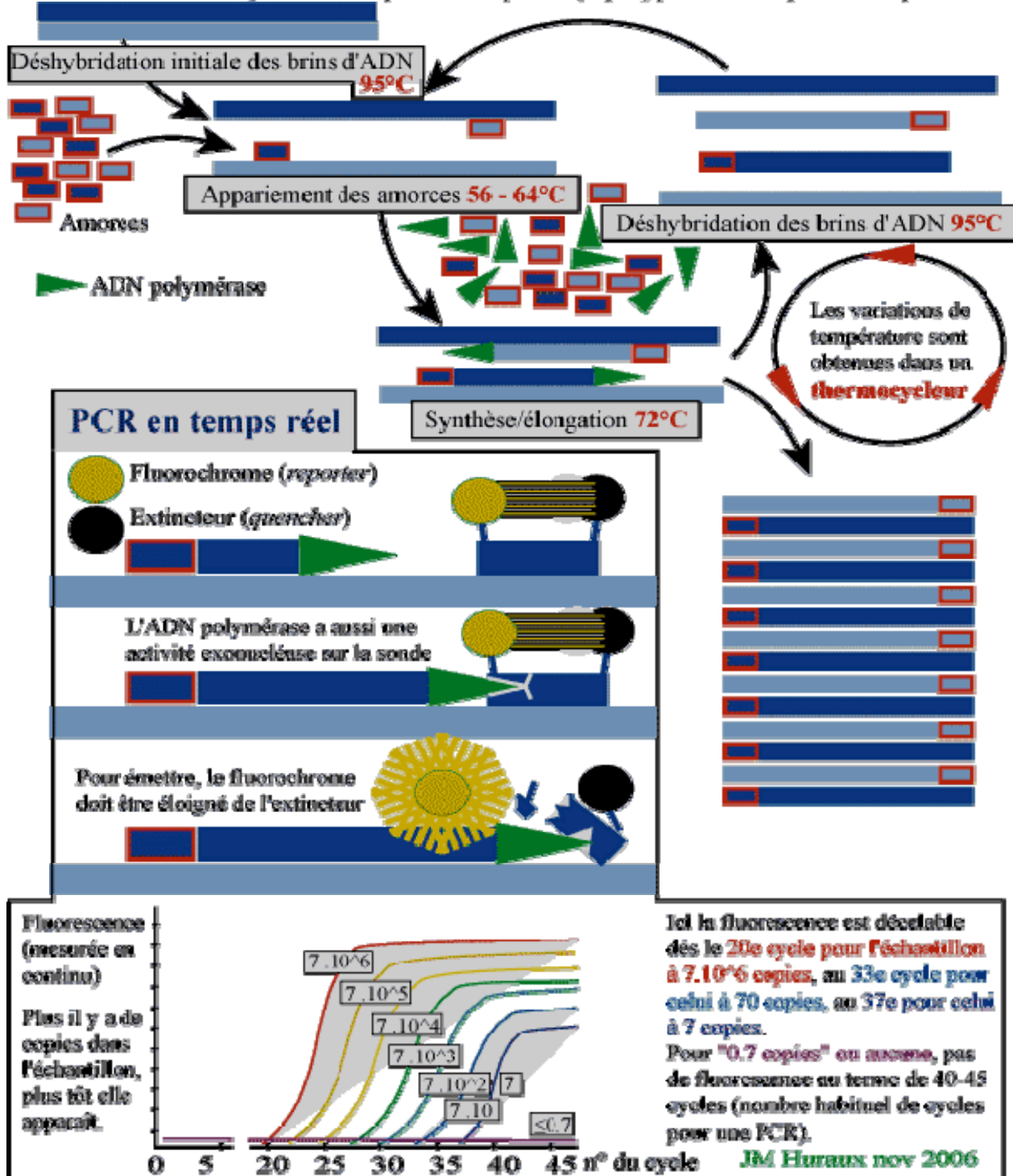
- Dénaturation de l'ADN à amplifier à 94°C ;
- Hybridation avec une amorce, appariement primer, annealing à 64°C
- Extension de l'amorce à 70-72°C par la Taq polymérase.

L'amplification est effectuée par la répétition des cycles qui assure une duplication exponentielle de chaque brin. La technologie de la PCR permet de mettre en œuvre les recherches habituelles de génie génétique, même si l'on ne dispose au départ que d'une faible quantité d'ADN (SIMPORE ,2006).

Figure 6 : Les différentes étapes de la PCR
 (F-CHUPS-Virologie-DCEM1 www.chups.jussier.fr)

PCR

La PCR (*polymerase chain reaction*) amplifie considérablement le nombre de copies d'une séquence d'ADN spécifique (amplicon) par une répétition de cycles thermiques faisant intervenir une paire d'amorces sens et anti-sens et une ADN polymérase résistant à haute température. La PCR en temps réel étudie la cinétique de la réaction grâce à une sonde émettant une fluorescence lors de l'amplification de l'amplicon (le fluorochrome est écarté d'un "extincteur" par l'ADN polymérase). De la cinétique (c'est-à-dire du 1er cycle donnant une fluorescence) on déduit la quantité d'amplicons (copies) présents au départ dans le prélèvement.



II.1.2 LA RÉTROSCRIPTASE / PCR (RT / PCR).

Les techniques d'amplification génique et d'hybridation amplifiée peuvent également être utilisées à des fins quantitatives pour estimer le niveau de réplication virale dans l'organisme. Cette quantification peut concerner le virus libre plasmatique (mesure de l'ARN viral ou la charge virale) ou le virus intégré dans les cellules sanguines mononuclées (mesure de l'ADN proviral) : la mesure de la charge virale reflète essentiellement la multiplication active du virus dans l'organisme alors que la quantification de l'ADN proviral représenterait la capacité de chaque individu à produire du virus. Les techniques de quantification de l'ARN viral plasmatique sont utilisées à grande échelle pour le suivi des personnes infectées depuis la mise sur le marché de troussees agréées.

II.1.2.1 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 T4 ou CD4, les principaux examens du suivi biologique de l'évolution de l'infection à VIH chez un patient (HU *et 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 *et al.*, 2006 ; BELAN *et 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 certain 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 *et 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 *et 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.

II.2.2 LA RT/PCR QUALITATIVE.

La transcription inverse est un processus dans lequel l'ARN monocaténaire est transcrit en ADN complémentaire (ADN_c). 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 *et al.*, 1996; ASSAL *et 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 ADN_c qui servira ensuite de matrice pour la PCR. Les ADN_c 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 ADN_c bicaténaires en grande quantité.

II.2.3 RÉALISATION D'UNE RT/PCR.

Pour réaliser une RT-PCR, il faut d'abord commencer par extraire les ARN ensuite les recopier in vitro en ADN_c simple brin. La synthèse du second brin d'ADN_c ainsi que la PCR sont effectués dans un deuxième temps par la Taq polymérase (ou par une autre ADN polymérase thermorésistante).

II.2.3.1 SYNTHÈSE DE L'ADN_c.

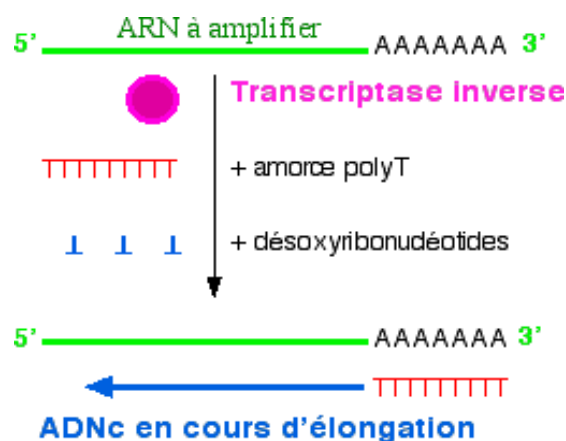
La synthèse d'ADN_c est catalysée par des transcriptases inverses (reverse transcriptase RT en anglais). Ces enzymes sont des ADN polymérases ARN dépendantes, capables d'utiliser un brin d'ARN comme matrice pour catalyser la synthèse du brin d'ADN complémentaire. Cela correspond effectivement à l'«inverse» d'une réaction de transcription de l'ADN en ARN.

Tableau III : Appariement des bases dans la synthèse de l'ADN_c.

ARN matrice	Appariement	ADN _c synthétisé
A	Avec	T
U	Avec	A
G	Avec	C
C	Avec	G

Les transcriptases inverses sont issues de rétrovirus dont elles sont une des principales caractéristiques (la transcriptase inverse du Virus du Myéloblastome Aviaire ou AMV, celle du Virus de la Leucémie Murine ou Mo-MLV). Comme toutes les ADN polymérases, les transcriptases inverses ne peuvent pas initier seules la synthèse d'un brin d'ADN. Elles ont besoin d'une amorce possédant une extrémité 3'-OH libre. Lorsque les ARN à amplifier sont polyadénylés en 3' (ARNm eucaryotes par exemple), l'amorce choisie peut être simplement une séquence polyT constituée d'une succession de désoxythymidines. Dans ce cas, tous les ARN_m sont a priori copiés en ADN_c. Il est aussi possible de réaliser l'étape de transcription inverse directement avec les amorces spécifiques de l'ARN d'intérêt, sans utiliser d'amorce polyT (non illustré). Dans ce cas, l'ADN_c obtenu est complémentaire du seul ARN d'intérêt.

Figure 7 : Schéma simplifié du principe de la réaction de transcription inverse en présence d'amorce polyT.

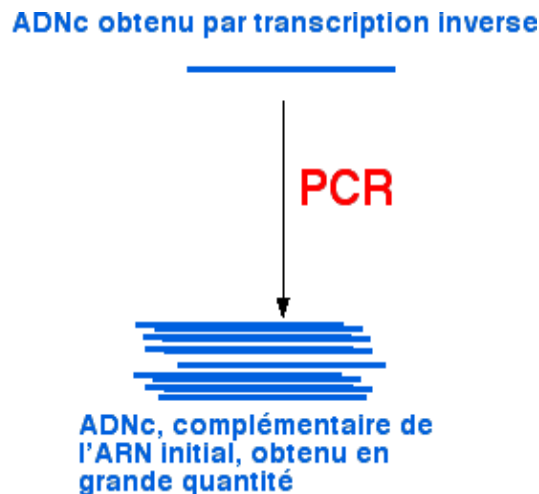


Selon les protocoles (nombreux et variés), il est recommandé d'inhiber la réaction de transcription inverse et de détruire ou dénaturer l'hybride ARN/ADN_c.

Dans un premier temps, la Taq polymérase catalyse la synthèse du second brin d'ADN_c en

utilisant le premier brin comme matrice. Ensuite, la PCR permet d'amplifier le fragment d'ADN_c. Certaines ADN polymérase ADN dépendantes thermostables comme celle de *Thermus thermophilus* (Tth), ont naturellement une activité transcriptase inverse en présence d'ions manganèse. D'où l'idée d'effectuer la réaction de transcription inverse et la PCR dans le même tube.

Figure 8 : La synthèse du second brin d'ADN_c par la Taq polymérase.



Le produit final est un ADN dont l'un des brins est complémentaire de l'ARN d'intérêt et l'autre brin à la même séquence que cet ARN d'intérêt (à la substitution près de U par T).

a) **II-3 EFFICACITE DE LA PCR.**

La majorité des protocoles expérimentaux donne une efficacité de PCR entre 1,75 et 2. Deux tendances s'affrontent alors, avec des arguments expérimentaux à l'appui. L'une considère que cette efficacité est une constante par amplicon (fragment amplifié) dans un protocole expérimentale donné. L'autre estime qu'elle varie toujours significativement et qu'elle nécessite d'être constamment remesurée. Le terme efficacité peut aussi avoir deux significations selon les auteurs :

- les premiers désignent l'ordre de l'exponentielle. L'équation de la cinétique s'écrit donc :

$$[\text{ADN}]_n = [\text{ADN}]_{\text{initiale}} \times E^n$$

- les seconds désignent la fraction de molécule d'ADN servant effectivement de matrice. L'équation devient alors :

$$[\text{ADN}]_n = [\text{ADN}]_{\text{initiale}} \times (1 + E)^n$$

Cette efficacité de la PCR est à prendre en compte car c'est un élément fondamental pour obtenir une mesure quantitative ou établir un protocole de PCR, mais elle est généralement négligeable pour un résultat qualitatif ou en PCR en point final. (*Wapedia. Wiki : Réaction en chaîne par polymérase*).

II.4 AUTRES TECHNIQUES DERIVÉES.

II.4.1 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.

II.4.2 PCR EN TEMPS RÉEL (REAL TIME PCR).

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. 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.

III- PROBLÉMATIQUE.

III.1 ENONCE DU PROBLEME ET CONTEXTE JUSTIFICATIF DE L'ETUDE.

En Afrique sub-saharienne, deux facteurs rendent compte des difficultés rencontrées pour atteindre une sécurité transfusionnelle optimale : existence dans la population générale d'une fréquence élevée d'infections diverses dont certaines sont transmissibles par transfusion sanguine. Outre la malaria, les infections par des agents transmissibles par transfusion sanguine comme les virus VIH/SIDA (VIH : virus de l'immunodéficience humaine ; SIDA syndrome de l'immunodéficience acquise) et ceux des hépatites B (VHB) et C ainsi que la syphilis sont très répandues dans la population générale en Afrique sub-saharienne (BATINA et *al.*, 2007), la prévention de leur transmission y constitue un problème de santé publique.

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 – 24 ans) fréquentant les services de soins prénataux urbains est passée de près de 4% en 2001 à un peu moins de 2% (OMS, 2006).

Chaque année la demande en poches de sang augmente et on assiste à l'apparition dans la population en générale de nouveaux cas d'infections dus au VIH et à d'autres maladies transmissibles par voie sanguine. Cette situation impose donc au CNTS de disposer de tests de validation biologique des produits sanguins répondants à des normes internationales afin de réduire la transmission d'un agent infectieux du donneur au receveur surtout dans le cas de donneur en période de séroconversion.

Dans ce contexte, l'utilisation de nouvelles stratégies de dépistage s'avèrent être nécessaire. En effet l'application des techniques de biologie moléculaire sur les dons de sang à travers le DGV (dépistage de génomes viraux) par la PCR permet de réduire la fenêtre silencieuse. Selon l'INVS, la réduction de la fenêtre avec le DGV est de 12 jours pour le VIH, 10 jours pour le VHC, 51 jours pour les anticorps anti-HTLV (responsable de la leucémie) et 38 jours pour l'AgHbs.

En octobre 2000, suivant une recommandation de l'union européenne sur l'introduction de la détection du génome viral sur les produits sanguins à base de plasma ou de sang à usage médical. Le ministère français de la santé a décidé d'adjoindre systématiquement le test de la

PCR au test ELISA de 3^{ème} génération dans la recherche des anticorps anti-VHC chez les donneurs de sang.

Le CNTS utilise plusieurs méthodes de dépistage du VIH applicables au sérum (ELISA et AXSYM). Quelles sont les différences entre ces tests en termes de spécificité, de sensibilité ?

Le diagnostic moléculaire par RT/PCR du VIH pourrait –il remplacer celui du dépistage des anticorps anti-VIH dans du sérum ou du plasma dans une banque de sang ? Quelle est l'efficacité d'une RT/PCR sur des pools d'échantillons ?

Sur le marché des réactifs de nombreux tests de dépistages rapides (TDR) VIH sont proposés. Quelles sont les résultats en termes de performances de ces tests rapides en dépistage précoce du VIH dans une banque de sang? Est –il possible d'utiliser de tels tests en transfusion sanguine pour la sélection des unités de sang ?

Quelles sont les prévalences des marqueurs infectieux du virus de l'hépatite B, de l'hépatite C et de la syphilis dans la population de donneurs de sang ?

Pour répondre à ces questions il nous a paru utile d'entreprendre cette étude.

IV- OBJECTIFS DE L'ETUDE.

IV.1 OBJECTIF PRINCIPAL.

Evaluer l'apport en terme de qualité du diagnostic précoce par RT / PCR du VIH-1 sur des pools d'échantillons de donneurs de sang du Centre National de Transfusion sanguine basé à Ouagadougou.

IV.2 OBJECTIFS SPÉCIFIQUES.

- Comparer, la sensibilité et la spécificité de la méthode ELISA lecteur de microplaques et celle de l'immunochromatographique AXSYM, tests de diagnostic de l'infection par le VIH utilisés au CNTS.
- Déterminer l'efficacité et évaluer la performance de trois (03) tests de dépistages rapides (TDR) couramment utilisés au Burkina Faso dans le diagnostic précoce des infections à VIH.
- Evaluer les prévalences des marqueurs infectieux du virus de l'hépatite B, de l'hépatite C et de la Syphilis chez les donneurs de sang et leur influence sur la quantité de poches de sang qualifiés disponibles au CNTS.
- Indiquer la (les) stratégie (s) de dépistage VIH la plus appropriée en transfusion sanguine. Participer activement à la lutte contre la pandémie du VIH SIDA au Burkina Faso dans la recherche d'une sécurité maximale dans le processus transfusionnel.

V- MATÉRIELS ET DÉMARCHES
MÉTHODOLOGIQUES.

V.1 CADRE DE L'ETUDE ET DEROULEMENT DES TRAVAUX.

L'étude s'est déroulée à Ouagadougou (BURKINA FASO) :

- Au Laboratoire du Centre National de Transfusion Sanguine(CNTS) comprenant 04 sections la sérologie où les échantillons ont été collectés, l'immuno-hématologie, la préparation et l'assurance qualité.
- 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.

V.2 COLLECTE DES ECHANTILLONS.

Au total 151 donneurs de sang ont été retenus pour l'étude. Il s'agit d'une population de donneurs réguliers et de donneurs irréguliers, âgés d'au moins 18 ans, de toutes professions et catégories sociales confondues. Le plasma a été prélevé d'août à décembre 2009 dans le laboratoire du CNTS soit sur des tubes imprégnés d'EDTA dans la section immuno-hématologie ou directement sur les poches de sang imprégnés de citrate en préparation après séparation du plasma et du concentré sanguin. Après centrifugation à 40000g pendant 5mn le plasma a été collecté dans des cryotubes de 1,8ml et conservés à -20°C.

Nous nous sommes également intéressé à des paramètres sur les donneurs tels que : le sexe, l'âge, le type de donneurs, le système utilisé pour le dépistage sérologique, le statut sérologique, le lieu du don de sang les co-infections etc. L'analyse de ces paramètres a permis de mieux appréhender le comportement des donneurs de sang face à l'infection au VIH et aux autres maladies virales transmissibles par transfusion sanguine.

V.3 CHOIX DES DONNEURS DE SANG.

Les donneurs de sang sélectionnés ont été testés soit à un système ELISA couplé à un spectrophotomètre lecteur de microplaques soit à l'AXSYM VIH Ag /Ab combo II. Ces deux méthodes sont des systèmes de diagnostics sérologiques du VIH utilisant des réactifs dits combinés ou de 4^{ème} générations.

V.3.1 CRITERES D'INCLUSION.

❖ SYSTÈME ELISA.

- Echantillons Négatif : $0,100 \leq D.O < 20 \%$ en dessous de la valeur seuil (V.S)
- Echantillons Douteux : 20% en dessous de la $V.S \leq D.O < V.S$
- Echantillons Positifs faibles : $V.S \leq D.O \leq 20 \%$ au dessus de la V.S

❖ SYSTÈME AXSYM.

- Échantillons Négatif : $0,65 < \text{Valeur de l'échantillon} < 0,90$.
- Échantillons Douteux (zone grise): $0,90 < \text{Valeur de l'échantillon} < 1$
- Échantillons Positifs faibles : $1 \leq \text{Valeur de l'échantillon} < 2$

V.3.2 CRITERES D'EXCLUSION.

❖ SYSTÈME ELISA.

- Echantillons Négatifs avec une densité optique inférieure à 0,100
- Echantillons positifs avec une densité optique située au dessus de 20% de la densité optique de la valeur seuil.
- Les plaques contaminées avec une D.O de la valeur seuil élevée (supérieure à 0, 200)

❖ SYSTÈME AXSYM.

- Les échantillons Négatifs avec une valeur inférieure à 0,65
- Echantillons Positifs avec une valeur supérieure à 2.
- D.O : Densité optique de l'échantillon

V.S : valeur seuil de la plaque analysée

V.4 PRÉSENTATION DES TESTS.

Les produits biologiques que nous avons examinés sont le sérum ou le plasma. Ces produits ont testés au laboratoire avec les différents kits de dépistage et nous avons pris comme méthode de référence la RT/PCR.

- ELISA couplé à un spectrophotomètre lecteur de microplaques.
- l'AXSYM VIH Ag /Ab combo II.
- Determine VIH-1/2.
- SD Bioline VIH ½ 3.0 (Multi).
- Immuno combII VIH ½ Bis pot.

V.4.1 LE TEST VIRONOSTIKA (BIOMERIEUX, PAYS BAS).

Au CNTS les réactifs utilisés pendant l'étude étaient soit le Vironostika VIH Uni-Form II Ag /Ab ou soit le Vironostika VIH Uni-Form II plus O.

V.4.1.2 PRINCIPE DU TEST VIRONOSTIKA VIH UNI- FORM II AG/AB.

Vironostika VIH Uni- form II Ag/Ab, est un test immuno- enzymatique (ELISA) basé sur le principe du « sandwich » en une étape. Un mélange d'antigènes du VIH et d'anticorps anti-VIH combiné à de la peroxydase de Raifort (HRP) sert de conjugué, le tétraméthyl benzidine (TBM) et le peroxyde sont utilisés comme substrat. La coloration qui apparaît à la fin du test indique la présence d'anticorps anti- VIH ou d'antigènes du VIH. L'absence de coloration ou une coloration très claire indique l'absence d'anticorps ou d'antigènes du VIH.

Les cupules microelisa sont recouvertes de plusieurs antigènes du VIH : gp160 du VIH-1, de peptide ANT703 du VIH-1, de peptide d'ENV du VIH-2 (acides aminés 592 –603) ; et d'anticorps anti p24 VIH-1.

Chaque cupule microelisa contient une sphère de conjugué l'HRP avec le mélange anticorps/antigène. Le diluant pour échantillons est tout d'abord additionné aux cupules afin de dissoudre la sphère. Ensuite, l'échantillon à tester ou le contrôle approprié contenant des anticorps, ou des antigènes VIH est incubé dans les cupules. Si des anticorps de VIH –1 et/ou VIH-2 sont présent dans l'échantillon, un complexe antigène / anticorps anti- VIH en phase solide se forme. Si l'antigène anti- VIH-1 est présent dans l'échantillon, un complexe anticorps/ antigène VIH-1/enzyme en phase solide se forme. Après lavage et incubation avec le substrat TMB, une coloration se développe qui vire au jaune au moment de l'arrêt de la

réaction par l'acide sulfurique. Si un anticorps l'anti-VIH1, anti-VIH2, anti-VIH1 groupe O et/ou un antigène VIH, est présent dans l'échantillon il se développe une coloration intense.

Au contraire, si l'échantillon ne contient aucun anticorps anti-VIH et aucun antigène VIH, le test présente une absence de coloration ou une coloration très claire après addition du substrat.

Interprétation des résultats :

- ✓ un résultat négatif signifie que l'échantillon testé ne contient pas d'anticorps anti-VIH1 anti-VIH2 anti- VIH1 groupe O ou d'antigène VIH-1 ou en dessous du seuil de détection du Vironostika VIH Uni- form II Ag/Ab.
- ✓ Un résultat positif signifie que l'échantillon testé contient des anticorps anti-VIH-1, anti-VIH2, anti- VIH1 groupe O et/ou des antigènes VIH-1 ou un facteur non spécifique.
- ✓ les échantillons positifs doivent être testés à nouveau. Si le test est à nouveau positif, l'échantillon est présumé porteur d'anticorps anti- VIH-1 anti-VIH2, anti- VIH-1 groupe O et/ou antigènes VIH-1.

Tout échantillon positif reproductible doit être soumis à un test de confirmation. Le Vironostika HIV Uni-form II Ag/Ab ayant une sensibilité élevée, lors de l'analyse des échantillons avec séroconversion précoce il est conseillé d'inclure un test d'antigène VIH sensible dans le test de confirmation.

Les échantillons positifs non reproductibles peuvent être dû à des conditions opératoires impropres :

- ✓ contamination par un échantillon fortement positif à travers le matériel ou des embouts de pipette.
- ✓ Contamination croisée provenant de gouttelettes d'humidité ou de réactifs.
- ✓ Contamination du substrat par des ions métalliques.
- ✓ Lavage ou aspiration incorrect au cours du procédé de lavage
- ✓ Erreur de lecture due au liquide résiduel du fond de la cupule ou à des bulles d'air dans la cupule.

Limite du test :

Tous les tests immunoenzymatiques très sensibles peuvent donner des réactions non spécifiques. C'est pourquoi, la spécificité des échantillons positifs reproductibles doit être confirmée avec une méthode appropriée.

V.4.2 AXSYM VIH AG / AB COMBO II.

V.4.2.1 PRINCIPE DE LA METHODE.

Le dosage AXSYM VIH Ag/Ab Combo est basé sur la technologie MEIA et utilise des microparticules recouvertes d'antigènes recombinants du VIH (*E.coli*) et d'anticorps (souris, monoclonaux) dirigés contre l'antigène p24 du VIH, afin de capturer les anti-VIH-1/VIH-2 et l'antigène p24 du VIH respectivement. Les anticorps / l'antigène capturés réagissent avec des antigènes recombinants, des peptides et des anticorps monoclonaux anti-p24, tous marqués à la biotine. Les complexes marqués à la biotine sont détectés par un complexe conjugué d'anticorps anti-biotine : phosphatase alcaline.

L'échantillon et tous les réactifs AXSYM VIH Ag/Ab Combo nécessaires à une série de dosage sont pipetés par l'aiguille d'échantillonnage dans différents puits d'une cartouche de réaction (CR) se trouvant dans l'unité d'échantillonnage. La CR est immédiatement transférée dans l'unité de traitement où le pipetage continue à l'aide de l'aiguille de traitement. Les réactions ont lieu dans l'ordre suivant :

- ✓ Un mélange réactionnel est préparé en combinant le diluant pour échantillons, l'échantillon et les microparticules recouvertes d'antigènes recombinants et d'anticorps monoclonaux dirigés contre l'antigène p24 du VIH dans le puits échantillon de la cartouche de réaction.
- ✓ Lorsque les anticorps anti-VIH-1/VIH-2 ou l'antigène p24 du VIH sont présents dans l'échantillon, ils se lient aux microparticules recouvertes pour former des complexes antigène-anticorps sur les microparticules.
- ✓ Une partie du mélange réactionnel (contenant des microparticules) est transférée sur la matrice.
- ✓ La matrice est lavée afin d'éliminer tout matériel non lié aux microparticules.

- ✓ Des antigènes recombinants, des peptides synthétiques et des anticorps monoclonaux anti-p24 du VIH marqués à la biotine sont distribués sur la matrice pour former des complexes immuns “antigène recombinant-anticorps humain-antigène biotinylé”
- ✓ La matrice est lavée afin d’éliminer tout matériel non lié aux microparticules.
- ✓ Le conjugué d’anticorps anti-biotine : phosphatase alcaline est distribué sur la matrice et se lie aux complexes immuns.
- ✓ La matrice est lavée afin d’éliminer tout matériel non lié aux microparticules.
- ✓ Le substrat, du phosphate de méthyl-4-ombelliféryl, est ajouté. Le conjugué marqué à la phosphatase alcaline catalyse la séparation d’un groupement phosphate du substrat, conduisant à l’obtention d’un produit fluorescent, le méthyl-4-ombelliférone. ce produit fluorescent est mesuré par le système optique MEIA.

- **RÉSULTATS**

Le protocole du dosage AXSYM VIH Ag/Ab Combo calcule la valeur seuil (CO) à partir de la valeur moyenne des 3 répliques du calibrateur indice et mémorise le résultat. La valeur seuil est déterminée en ajoutant 27,5 à la valeur moyenne du calibrateur indice.

“Valeur seuil (CO) = Echantillon / Valeur seuil”

Tableau IV : Résultats AXSYM VIH Ag/Ab Combo.

Résultat	Annotation	Interprétation	Procédure de Réanalyse
Initial (S/CO)			
≥ 1,00	REACTIVE	Réactif (positif)	Réanalyse en double
0,90 à < 1	GRAYZONE	zone grise (réactive)	Réanalyse en double
< 0,90*	NEGATIF	Négatif	Réanalyse inutile

*si l’option 2 est sélectionnée pour le paramètre 80, NEGATIVE se traduit par l’annotation “< 1.00 S/CO”.

V.4.3 DETERMINE VIH –1/2 (ABOTT, DIVISION DIAGNOSTIC, FRANCE).

V.4.3.1 PRINCIPE DE LA METHODE.

Abbot Determine est un test immuno chromatographique pour la détection qualitative des anticorps anti- VIH ½. L'échantillon est déposé sur la zone de dépôt de l'échantillon. Quand l'échantillon migre jusqu'à la zone du conjugué, il se reconstitue et se mélange avec le conjugué colloïde de sélénium –antigène. Ce mélange continue de migrer sur la phase solide jusqu'aux antigènes recombinants immobilisés et aux peptides synthétiques au niveau de la fenêtre – patient.

Si les anticorps anti- VIH ½ sont présent dans l'échantillon, ils se lient à l'antigène du conjugué antigène- colloïde de sélénium et à l'antigène de la fenêtre – patient en formant une ligne rouge.

Si les anticorps anti- VIH ½ sont absents, le conjugué antigène – colloïde de sélénium traverse la fenêtre patient sans donner de ligne rouge. La barre de contrôle de la procédure est incluse dans ce système de test afin d'assurer la validité du test.

- **Interprétation des résultats**

- ✓ **VALIDATION : contrôle de qualité**

Le contrôle de la procédure annotée (control) est inclus dans le système afin d'assurer la validité du test. Si la barre de contrôle ne vire pas au rouge à la fin du test, le résultat n'est pas valide et l'échantillon doit être ré analysé.

- **RESULTATS :**

- ✓ **POSITIF : Deux barres**

Les barres rouges apparaissent dans la fenêtre – contrôle et la fenêtre patient (control et patient) sur la bandelette.

Toute couleur rouge visible dans la fenêtre patient doit être interprétée comme résultat positif.

- ✓ **NEGATIF : Une barre**

Une barre rouge apparaît dans la fenêtre contrôle (annotée « control ») la barre rouge de la fenêtre patient (annotée patient) n'apparaissant pas la bandelette.

Le résultat est non valide si la barre rouge n'apparaît dans la fenêtre contrôle. ce résultat est aussi non valide si une barre rouge apparaît dans la fenêtre patient pas dans celle de la fenêtre contrôle.

Le test doit être recommencé si le problème persiste, contacter le «service clients Abbot».

- **REMARQUE**

Le résultat du test est positif même si la barre patient est plus claire ou plus foncée que la barre contrôle.

- **LIMITES DE LA METHODE :**

Le test Abbot VIH1/2 est destiné à détecter les anticorps anti VIH-1 et VIH-2 dans le sérum,

Le plasma et le sang total humains. D'autres liquides biologiques risquent de fournir des résultats imprécis. L'intensité de la barre patient n'est pas nécessairement corrélée avec le titre de l'anticorps se trouvant dans l'échantillon.

Un résultat négatif par Determine VIH ½ n'exclut pas la possibilité d'une infection par le

VIH. Un résultat faussement négatif peut être obtenu dans les circonstances suivantes :

- Faibles taux d'anticorps (début de séroconversion) en dessous de la limite de détection du test.
- Infection par un variant du virus moins facilement détectable par la configuration des tests Determine VIH ½.
- Patient présentant des anticorps anti- VIH qui ne réagissent pas avec les antigènes spécifiques utilisés dans la configuration du test.
- Condition de traitement de l'échantillon provoquant une perte de polyvalence de l'anticorps anti- VIH.

Pour ces différentes raisons, il faut prendre des précautions lors de l'interprétation des résultats négatifs. D'autres données cliniques (par exemple symptômes ou facteurs de risque) devront être utilisées en association avec le test.

Des résultats positifs devront être ré analysé en utilisant une autre méthode et les résultats devront être évalués à la lumière clinique globale avant d'établir un diagnostic.

Des échantillons de sang total ou de plasma contenant des anticoagulants autre que l'EDTA peuvent donner des résultats incorrects.

V.4.4 SD BIOLINE VIH-1/2 3.0 (MULTI).

Le SD Bioline VIH-1/2 est un test immunochromatographique pour la détection qualitative des anticorps de tous les iso types (IgG, IgM, IgA). Spécifique au VIH-1 et VIH-2 dans le sérum, le plasma et le sang total humain.

- **PRINCIPE**

SD Bioline VIH-1/2 contient une membrane tapissée respectivement avec le recombinant VIH-1 sur une bande 1 (gp 46, p24) et le VIH-2 sur une bande 2 (gp31). Le conjugué colloïdal et le sérum migre par chromatographie le long de la membrane vers la région du test(T) et forme un complexe antigène-anticorps-antigène de grande sensibilité et spécificité qui se manifeste par une ligne visible .ce test est constitué de trois repères 1,2, et C. ligne1 (VIH-1), ligne 2 (VIH-2) et la ligne de contrôle C. aucune de ces lignes n'est visible avant le test.

La ligne de contrôle est utilisée pour le contrôle procédural et doit à chaque fois apparaître si le test est correctement réalisé.

- **PROCÉDURE**

- 1- Enlever la plaquette de son enveloppe, le placer sur une surface plane et sèche
- 2- Ajouter 10µl de plasma ou de sérum (20µl du spécimen de sang)
- 3- Ajouter 4 gouttes de diluant (environ 120 µl) dans la fenêtre.
- 4- Aussitôt que le test commence, on aperçoit une couleur pourpre se déplacer le long de la fenêtre au centre de la plaquette.
- 5- Interpréter les résultats entre 5 et 20 minutes.

- **INTERPRETATION DU TEST**

- 1- L'apparition d'une bande colorée de la cote gauche de la fenêtre des résultats indique que le test fonctionne.
- 2- La présence de deux lignes ; la ligne de contrôle (C) et la ligne 1 dans la fenêtre des résultats indique le résultat positif pour le VIH-1.
- 3- La présence de deux lignes ; la ligne de contrôle (C) et la ligne dans la fenêtre des résultats indique le résultat positif pour le VIH-2.
- 4- La présence de trois lignes ; la ligne de contrôle (C), la ligne 1 et la ligne de contrôle 2 dans la fenêtre des résultats indique le résultat positif pour le VIH-1 et/ou VIH-2.

Si l'intensité de la couleur de la ligne 1 est plus foncée que celle de la ligne 2 on considère le VIH-1 positif.

Si l'intensité de la couleur de la ligne 2 est plus foncée que celle de la ligne 1 on considère le VIH-2 positif.

V.4.5 IMMUNOCOMB II (ORGENICS, FRANCE).

Le test utilisé était IMMUNOCOMBII® VIH-1 et VIH-2 Bis pot de PBS ORGENICS.

- **MATERIELS**

- Pipette de précision avec embout à usage unique pour la distribution de 50µl.
- Ciseaux
- Chronomètre de laboratoire ou montre
- Papier absorbant

- **PRINCIPE :**

La trousse IMMUNOCOMBII® VIH-1 et VIH-2 Bis pot est un test immuno-enzymatique indirect en phase solide (EIA). La phase solide est un peigne de 12 dents, chaque dent étant sensibilisée à sa surface de trois points ou spots de réaction :

- ✓ Spot supérieur, anticorps de chèvre anti-immunoglobulines humaines servant de contrôle interne ;
- ✓ Spot médian, peptides synthétiques VIH-2 ;
- ✓ Spot inférieur, peptides synthétiques VIH-1.

Tous les réactifs nécessaires à la réalisation du test sont prêts à l'emploi et pré-distribués dans le bac de développement qui est divisé en 6 compartiments (A-F) de 12 puits chacun, chaque compartiment correspondant à un réactif et à une étape du test.

- **MODE OPERATOIRE :**

Avant d'entamer la distribution des sérums il est important de :

1. Equilibrer réactifs et échantillons à tester à la température ambiante et exécuter le test à la température ambiante.
2. Distribuer 50µl de chaque échantillon et contrôle dans les puits du compartiment A du bac de développement et homogénéiser ; jeter l'embout dans un conteneur de déchets contaminés.
3. Insérer le peigne dans le compartiment A et procéder comme indiqué dans ce tableau :

Tableau V : Résumé du mode opératoire

Etape	Compartiment	Opération
Réaction antigène /anticorps	A	Homogénéiser ; incubé 10 mn ; absorber
Lavage	B	Agiter ; incubé 2 mn ; absorber
Conjugué	C	Homogénéiser ; incubé 10mn ; absorber
Conjugué	D	Agiter ; incubé 2 mn ; Absorber
Lavage	E	Agiter ; incubé 2 mn ; Absorber
Révélation	F	Homogénéiser ; incubé 10mn
Réaction d'arrêt	E	Incuber 1mn ; sécher à l'air

• **RESULTATS ET VALIDATION :**

Pour confirmer le bon fonctionnement du test et valider les résultats les conditions suivantes doivent être remplies :

1. Le contrôle positif doit présenter trois spots sur la dent.
2. Le contrôle négatif doit présenter uniquement le spot supérieur ou spot de contrôle interne.
3. Tout échantillon testé doit présenter le spot de contrôle interne confirmant un dépôt correct de l'échantillon.

Si une de ces conditions n'est pas remplie, les résultats ne peuvent être validés. Dans ce cas, échantillons et contrôle doivent être retestés

Lecture des résultats: Lorsqu'une dent affiche uniquement le spot supérieur de contrôle interne, l'échantillon correspondant n'est pas réactif pour les anticorps anti-VIH-1 et anti-VIH-2.

Un spot médian circulaire et uniformément coloré, indique la présence d'anticorps anti-VIH-2.

Un spot inférieur, circulaire et uniformément coloré, indique la présence d'anticorps anti-VIH-1.

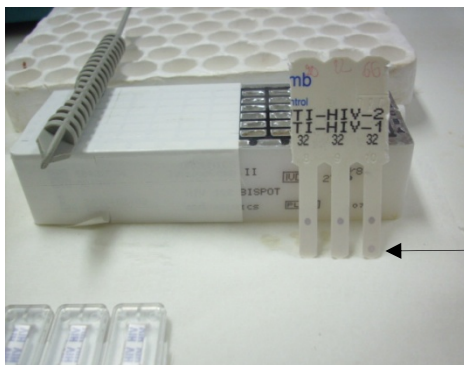
Certains échantillons contenant des concentrations élevées en anticorps anti-VIH-1 ou anti-VIH-2 peuvent occasionner des réactions croisées en affichant un spot secondaire faible associé à un spot principal plus intense correspondant à l'antigène homologue.

Tout résultat indiquant la présence d'anticorps anti-VIH-1 ou anti-VIH-2 doit être confirmé par un test de confirmation.

Figure 9: A gauche Spectrophotomètre lecteur de microplaques à droite appareillage de l'AXSYM VIH-1/2 Combo.



Figure 10 : Test rapide Immunocomb II VIH-1/2.



Tache VIH-1(positif) vers le bas et témoin au dessus.

Figure 11 : Photos de tests rapides VIH (à gauche Determine™ VIH-1/2 Inverness et à droite SD Bioline).



Bande témoin de la réaction

V.5 DIAGNOSTIC MOLECULAIRE PAR RT/PCR DU VIH-1.

V.5.1 ELABORATION DES POOLS D'ÉCHANTILLONS (CERBA-Labiogene).

Les échantillons douteux (zone grise), les positifs et les négatifs sont repartis en groupe de 5 en fonction du système utilisé pour les collectés (AXSYM ou ELISA). Et le mélange se déroule comme suit :

- 200µl de plasma sont versés par échantillon dans un tube eppendorf de 1,8ml environ tout le processus se passe sous la hôte.
- L'ensemble est alors porter à 1 ml homogénéiser et soumis au vortex pendant 10 secondes. On obtient un pool d'échantillon d'un volume de 1ml.

V.5.2 EXTRACTION DE L'ARN VIRAL (kit d'extraction Analytikjena).

L'extraction peut se résumer en quelques étapes principales qui sont :

- Transférer 150µl de plasma de chaque pool dans de nouveaux tubes eppendorf.
- Ajouter 450µl de RL dans chaque tube puis vortexer pendant quelques secondes et incubé 15mn à température ambiante.
- Ajouter 600µl de RBS dans chaque tube puis vortexer un moment.
- Transférer 650µl de l'ensemble dans des tubes colonnes .Centrifuger à 12000rpm pendant 1mn.
- Mettre le restant de la solution dans les tubes colonnes et centrifuger à 12000rpm pendant 1mn.
- Jeter les tubes collecteurs et mettre les tubes colonnes dans de nouveaux tubes collecteurs.
- Ajouter 500µl de HS puis centrifuger à 12000rpm pendant 1mn, ensuite mettre les tubes colonnes dans de nouveaux tubes collecteurs.
- Ajouter 650µl de LS et centrifuger à 12000rpm pendant 1 mn et mettre les tubes colonnes dans de nouveaux tubes collecteurs.
- Centrifuger à 14000rpm 2mix (2 fois).
- Mettre les colonnes dans de nouveaux tubes eppendorf : ajouter 50µl RNase Free Water à 8000rpm pendant 1mn. L'ARN est ainsi éluée des colonnes.

V.5.3 OBTENTION DE L'ADN_c

▪ **Rétrotranscription**

Le Master-Mix utilisé pour la rétrotranscription 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
- 10µl d'ARN extrait

La rétrotranscription 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 rétrotranscrit en ADN_c. L'amplification a consisté en 35 cycles de :

- Dénaturation : 94°C 40s
- Hybridation : 60°C 45s
- Extension : 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 2%. 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.

Figure 12: Thermocycleur 9700 (Applied Biosystems).



V.5.4 PREPARATION DU 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 2%
- 4g d'agarose +200ml de TBE 1X
- Cuisson à micro onde (2mn, 460W)
- Ajout de 16µl de Bromure d'Ethidium (10mg/ml)
- Le gel est coulé délicatement dans la cuve à électrophorèse (BIO-RAD)

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.

3 µl de bleu de migration }
Par échantillon/puits

8 µl d'ADNc amplifié

3 µl du ladder dans le puit n°1

- Electrophorèse et Révélation sous UV

Course de l'électrophorèse : 120V pour 45minutes Révélation sous UV – Photo.

V.6 ANALYSES STATISTIQUES.

Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel standard Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 17 pour windows et par le logiciel EpiInfo version 6. Les données recueillies avaient été saisies sur Excel 2003. Le seuil de signification statistique a été fixé à $p < 0,050$.

V.6.1 PERFORMANCES DES TESTS UTILISES.

Vp : Vrai Positif

Fp: Faux Positif

Vn: Vrai Négatif

Fn : Faux Négatif

SENSIBILITE : Capacité d'un test à pouvoir détecter les sujets malades dans une population donnée ; mesure ainsi l'aptitude d'un test à éliminer les faux négatifs.

$$Se = \frac{Vp * 100}{Vp + Fn}$$

SPECIFICITE : Capacité d'un test à détecter des sujets sains dans une population donnée ; mesure ainsi l'aptitude d'un test à éliminer les faux positifs.

$$Sp = \frac{Vn * 100}{Vn + Fp}$$

VALEUR PREDICTIVE POSITIVE : Probabilité pour qu'un patient chez qui un test est positif soit réellement atteint de la maladie.

$$Vpp = \frac{Vp * 100}{Vp + Fp}$$

VALEUR PREDICTIVE NEGATIVE : Probabilité pour qu'un patient chez qui un test est négatif ne soit pas atteint de la maladie.

$$VPN = \frac{Vp * 100}{Vn + Fn}$$

La prévalence influe beaucoup sur la valeur prédictive.

Normes OMS : Se = 99 % ; SP = 99 %

EFFICACITE : Aptitude globale à identifier avec exactitude tous les positifs et tous les négatifs (absence de faux positif et de faux négatif).

Elle combine Se et Sp de l'épreuve et donne une idée de son efficacité total.

$$\text{Efficacité} = \frac{Vp + Vn}{Vp + Fp + Vn + Fn} * 100 = \frac{Vp + Vn}{N}$$

N= Nombre d'échantillons analysés

VI-RESULTATS ET DISCUSSION.

VI.1 RESULTATS.

VI.1.1 PARAMÈTRES DES DONNEURS.

Les donneurs inclus (151) dans l'étude ont un âge compris entre 17 et 49 ans et la tranche d'âge la plus présente est celle de 18 à 23 ans avec un pourcentage de 12,6% (19 / 151). Les donneurs de sexe masculin sont les plus représentés. Il y'a en effet 84% (127/151) de donneurs de sexe masculin contre 16 % (24/151) de donneurs de sexe féminin (tableau VI). Le sex-ratio homme / femme de notre étude est de 5,30 (127/27). Les donneurs ont été repartis en catégories suivant le lieu du don :

- **ARMEE** (tout les corps habillés).
- **SCOLAIRES** (élèves et étudiants des universités et des grandes écoles).
- **SALARIES** (fonctionnaires et travailleurs d'entreprises).
- **EGLISES** (lieux de cultes).
- **HORS** (collecte hors de Ouagadougou).
- **CRTS** (collecte fixe au centre régional de transfusion sanguine)

Un donneur est qualifié de donneur régulier après en moyenne 3 dons / an et s'il a moins de 3 dons /an il est un donneur non régulier. Les sujets étudiés (donneurs de sang) comprennent 84 % (127/151) de donneurs non réguliers et 16 % (24/151) de réguliers (tableau VI).

Nous avons obtenu 55% (83/151) de statut VIH positifs et 45% (68/151) de statut VIH négatifs. La répartition du statut VIH en fonction du lieu du don donne respectivement pour le statut VIH positif des donneurs, 67% (10/15) pour l'ARMEE, 62% (29/47) au CRTS, les SALARIES 60% (3/5) et les SCOLAIRES 42% (22/52) (tableau VI).

Tableau VI: Lieu du don, Sexe, Types de donneurs et Statut VIH.

LIEU DU DON N(%)	ARMEES	CRTS	EGLISES	HORS	SALARIÉS	SCOLAIRES	TOTAL N(%)
SEXE N(%)							
FEMMES N(%)	0 (0)	5 (10)	1 (17)	6 (23)	1 (20)	11(21)	24 (16)
HOMMES N(%)	15 (100)	42 (90)	5 (83)	20 (77)	4 (80)	41(79)	127(84)
TYPES DE DONNEURS	ARMEES	CRTS	EGLISES	HORS	SALARIÉS	SCOLAIRES	TOTAL N(%)
NON REGULIERS N(%)	12(80)	34(72)	3(50)	25(96)	5(100)	48(92)	127(84)
REGULIERS N(%)	3(20)	13(28)	3(50)	1(04)	0(0)	4(08)	24(16)
STATUT VIH N(%)	ARMEES	CRTS	EGLISES	HORS	SALARIÉS	SCOLAIRES	TOTAL N(%)
NEGATIFS N(%)	5 (33)	18 (38)	2(33)	11(42)	2(40)	30(58)	68(45)
POSITIFS N(%)	10(67)	29(62)	4(67)	15(58)	3(60)	22(42)	83(55)

VI.1.2 SYSTÈMES D'ANALYSES ET STATUT VIH.

Le tableau VII ci-dessous indique que 30% (46/151) et 70% (105/151) des échantillons collectés dans notre étude viennent respectivement de l'AXSYM et de l'ELISA. Ces deux systèmes d'analyses donnent des résultats équivalents pour la détection du VIH-1/2 chez les donneurs.

Tableau VII: Systèmes d'analyse et statut VIH.

SYSTÈMES D'ANALYSES	STATUT VIH		TOTAL
	NEGATIFS N(%)	POSITIFS N(%)	
AXSYM (1)	18 (26)	28 (34)	46 (30)
ELISA (2)	50 (74)	55 (66)	105 (70)
TOTAL	68 (100)	83 (100)	151

$(X^2 = 0.93 ; p = 0.34).$

VI.1.3 ÉVALUATION DU STATUT VIH EN FONCTION DU TYPE DE DONNEURS.

Nous avons comparé le statut VIH chez les donneurs réguliers et non réguliers de notre étude. Comme l'indique le tableau VIII ci-dessous, 82% (68/83) des sujets VIH positifs et 87% (59/68) des sujets VIH négatifs sont des donneurs non réguliers ; alors que 18% (15/83) des sujets VIH positifs et 13% (9/68) des sujets VIH négatifs sont des donneurs réguliers. Le statut VIH est le même chez ces deux types de donneurs.

Tableau VIII: Comparaison entre les Types de donneurs et le Statut VIH.

TYPES DE DONNEURS	STATUT VIH		TOTAL
	NEGATIFS N (%)	POSITIFS N (%)	
NON REGULIERS (1)	59 (87)	68 (82)	127 (84)
REGULIERS (2)	9 (13)	15 (18)	24 (16)
TOTAL	68	83	151

$(X^2 = 0.65 ; p = 0.42).$

VI.1.4 EVALUATION DES TESTS RAPIDES EN FONCTION DU STATUT VIH.

Le tableau IX-1 indique que 38% (13/34) des sujets Statut VIH négatifs sont positifs au test Determine ; alors que 53% (62/117) des sujets Statut VIH positifs sont par contre négatifs au Determine.

Tableau IX-1 : Statut VIH et Determine

STATUT VIH	DETERMINE ⁽¹⁾ N (%)	
	NEGATIFS	POSITIFS
NEGATIFS ^(a)	55 (47)	13 (38)
POSITIFS ^(b)	62 (53)	21(62)
TOTAL	117(100)	34 (100)

***P^{(1) → (a), (b)} = 0,503: NS (Non Significatif). Determine et le statut VIH.**

Tableau IX-2 : Statut VIH et SD-Bioline.

STATUT VIH	SD-BIOLINE ⁽²⁾ N(%)	
	NEGATIFS	POSITIFS
NEGATIFS ^(a)	65(44)	3(60)
POSITIFS ^(b)	81(56)	2(40)
TOTAL	146(100)	5(100)

***P^{(2) → (a), (b)} = 0,468: NS (Non significatif). SD-Bioline et le statut VIH.**

Le tableau IX-2 indique que 44% (65/146) des sujets Statut VIH négatifs sont également négatifs au test SD-Bioline ; tandis que 56 % (81/146) des sujets Statut VIH positifs sont par contre négatifs au SD-Bioline.

Tableau IX-3 : Statut VIH et ImmunoComb.

STATUT VIH	IMMUNOCOMB ⁽³⁾ N(%)	
	NEGATIFS	POSITIFS
NEGATIFS ^(A)	66(45)	2(67)
POSITIFS ^(B)	82(55)	1(33)
TOTAL	148(100)	3(100)

***P^{(3) → (a),(b)} = 0, 052: S (Significatif). ImmunoComb et statut VIH.**

Le tableau VIII-3 montre que 67% (2/3) des sujets positifs à l'ImmunoComb ont un Statut VIH négatifs ; par contre 55% (82/148) des sujets Statut VIH positifs sont négatifs à

l'ImmunoComb. Nous avons confronté les résultats entre le SD-Bioline et l'ImmunoComb, il semble que ces deux tests donnent des résultats similaires ($p^{(2) \rightarrow (3)} = 0,72$).

VI.1.5 COMPARAISON ENTRE LE STATUT VIH, LES TYPES DE DONNEURS ET LES CO-INFECTIONS.

Le tableau X-1 montre que 75% (113/151) des donneurs inclus dans l'étude n'ont aucune co-infection, 91% (20/22) des donneurs non réguliers ont contractés l'hépatite B et 25 % (6/8) des donneurs réguliers ont le marqueur du VHC.

En confrontant le statut VIH aux co-infections, il est ressortit que 62,5% (5/8) des donneurs statut VIH négatifs sont atteints de l'hépatite C et 64% (14/22) des donneurs statut VIH positifs ont l'hépatite B (tableau X-2).

Tableau X-1 : Types de donneurs et Co-Infections.

TYPES DE DONNEURS	CO-INFECTIONS n(%)					
	AUCUNE CO- INFECTION	SYPHILIS	VHB	VHB - VHC	VHC	VHC - SYPHILIS
NON REGULIERS	94 (83)	5 (100)	20 (91)	1 (50)	6 (75)	1 (100)
REGULIERS	19 (17)	0 (0)	2 (9)	1 (50)	2 (25)	0 (0)
TOTAL	113	5	22	2	8	1

Tableau X-2 : Statut VIH et Co-Infections.

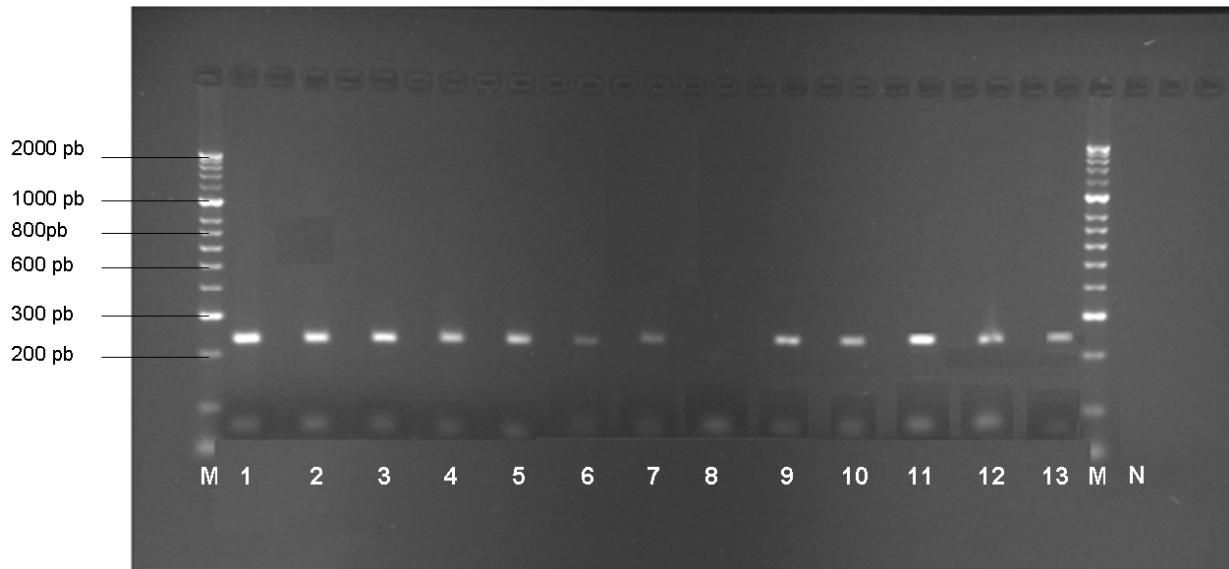
STATUT VIH	CO-INFECTIONS n(%)					
	AUCUNE CO-INFECTION	SYPHILIS	VHB	VHB- VHC	VHC	VHC-SYPHILIS
NEGATIFS	52 (46)	2 (40)	8 (36)	1 (50)	5(62.5)	0 (0)
POSITIFS	61 (54)	3 (60)	14(64)	1(50)	3(37.5)	1 (100)
TOTAL	113	5	22	2	8	1

**p>0,05*

VI.1.6 RÉSULTATS DE LA RT/PCR SUR LES POOLS ET LES ÉCHANTILLONS INDIVIDUELS.

La migration électrophorétique des produits de la PCR, a été suivit d'une révélation sous UV et la photographie.

Figure 13 : Révélation du produit de la PCR sur Gel des pools d'échantillons.



Légende :

M = Le ladder ou marqueur de poids moléculaire.

Puits 13 = contrôle positif.

N = contrôle négatif

Au niveau des puits **1, 2, 3, 4, 5, 6,7** nous avons des bandes visibles: pools positifs en RT/PCR et aucune bande n'est visible au puits **8** : pool négatifs en RT/PCR. Les puits **9, 10, 11, 12** correspondent à des échantillons individuels positifs à la RT/PCR.

Les produits se sont formés entre 200 et 300 paires de base (pb) ; ce qui correspond à la taille du fragment attendu (233 pb). Tous les pools et échantillons qui ont montré des bandes visibles sur le gel étaient donc infectés par le VIH-1, et les donneurs correspondants ont été déclarés VIH-1 positifs.

Tableau XI : Résultats RT/PCR sur les pools.

POOLS	ELISA	AXSYM	PCR -(%)	PCR + (%)	TOTAL
NEGATIFS	8 (80%)	2 (20%)	10 (100%)	0 (0%)	10
DOUTEUX	5 (83,30%)	1 (16,70%)	1 (16,70%)	5 (83,30%)	6
POSITIFS	5 (62,50%)	3 (37,50%)	0 (0%)	8 (100%)	8
TOTAL	18	6	11	13	24

PCR - : Pool négatif à la RT/PCR ; **PCR+** : Pool positif à la RT/PCR.

❖ **BILAN**

- **L'ELISA** : PCR+ = (5 pools de VIH+ et 4 pools de douteux) ;
PCR- = (0 pool de VIH+, 1 pool de douteux et 8 pools de VIH-).
- **l'AXSYM** : PCR+ = (3 pools de VIH+, 1pool de douteux et 0 pool de VIH-) ;
PCR- = (0 pool de VIH+, 0 pool de douteux et 2 pools de VIH-).

Au total 24 pools de 5 échantillons chacun ont été passés à la RT/PCR.

Les pools d'échantillons négatifs au VIH (10 pools) à l'ELISA et à l'AXSYM ont été confirmés négatifs par la RT/PCR du VIH-1.

Sur l'ensemble des pools de douteux (6 pools) issus des deux systèmes d'analyses (ELISA, AXSYM), 5 pools étaient positifs à la RT/PCR du VIH-1 et 1 pool était négatif.

Tous les pools de positifs au VIH (8 pools) ont également été confirmés positifs à la RT/PCR du VIH-1.

VI.1.6.1 DETERMINATION DE LA CHARGE VIRALE PLASMATIQUE (CVP).

Nous avons déroulé 6 pools négatifs et fait passer individuellement 30 échantillons à la RT/PCR. Les échantillons ont tous été confirmés négatifs par la reprise à la RT/PCR. Ensuite nous avons procédé à un contrôle de qualité en faisant la charge virale sur 10 échantillons. Le dispositif utilisé était un Real time PCR, un M2000(Abbott).

Figure 14: Real Time PCR ABBOTT M2000 RT 7500 Applied BIOSYSTEMS.



Tableau XII: Résultats de la charge virale sur 10 échantillons.

Echantillons numéros	13	23	30	36	37	96	100	103	106	138
Charge Virale	Pas détecté	Pas détecte	Pas détecté	Pas détecté	Pas détecté	Pas détecté	Pas détecté	Pas détecté	Pas détecté	Pas détecté

Seuil de détection de real time PCR < 40 copies/ml

❖ BILAN

Aucune copie de virus n'a été détectée sur les 10 échantillons. La charge virale a confirmé le statut VIH négatif des 10 échantillons et partant de là de nos pools de négatifs à la RT/PCR du VIH-1.

Nous pouvons donc envisager les calculs de sensibilité, de spécificité, d'efficacité, des valeurs prédictives négatives et positives des tests utilisés de dépistage VIH dans notre étude.

VI.1.6.2 PERFORMANCES DES TESTS ELISA ET AXSYM.

Tableau XIII : Résumé des performances de l'ELISA et de l'AXSYM

TESTS	SENSIBILITE	SPECIFICITE	VPP	VPN	EFFICACITE
ELISA	100 % (45/45)	90 % (45/50)	90 % (45/50)	100 % (45/45)	94,74 % (90/95)
AXSYM	100 % (20/20)	100 % (10/10)	100 % (20/20)	NC	100 % (30/30)

- VPP : Valeur prédictive positive du test. ; VPN : Valeur prédictive négative du test.

NC= non calculée (30 échantillons) : Le nombre réduit d'échantillons collecté à partir de l'AXSYM ne permet pas le calcul de la valeur prédictive positive de ce test (>100 %).

L'ELISA et l'AXSYM ont une sensibilité de 100 % et seul l'ELISA a une efficacité de 100 %.

VI.1.6.3 PERFORMANCES DES TESTS RAPIDES.

Le Statut VIH définitif des échantillons analysés au CNTS est établi par un algorithme d'analyse puissant. C'est un processus de reprise des échantillons par un test combiné différent de celui utilisé en première analyse. Ensuite sanctionné par un contrôle de qualité avec un test de confirmation qui le western blot pour les échantillons qui présentent toujours un résultat discordant.

La comparaison des résultats issus des tests rapides par rapport à la PCR n'aurait pas été plus intéressante. Nous aurions obtenu des pourcentages assez faibles (Sensibilité, Spécificité, VPP, VPN et Efficacité.) .Cela parce qu'il existe une baisse remarquable de la performance des tests rapides sur les sujets en phase d'infection précoce. En effet, 3 mois après une exposition à risque sont nécessaires pour établir un diagnostic VIH positif exacte avec un test rapide.

Nous avons donc considéré le statut VIH comme un test de confirmation pour les sujets en primo-infection. Ceci pour évaluer les performances des 3 tests rapides par rapport au système de sécurité transfusionnelle déjà en place au CNTS au moment de la collecte.

Tableau XIV :Performance des TDR : Determine , SD-bioline et ImmunoComb.

TESTS RAPIDES (TDR)	SENSIBILITE	SPECIFICITE	VPP	VPN	EFFICACITE
DETERMINE VIH -1/2	57,24% (83/145)	83,95% (68/81)	86,46% (83/96)	63,85% (83/130)	66,81% (151/226)
SD-BIOLINE VIH-1/2	50,61% (83/164)	95,77 % (68/71)	96,51 % (83 /86)	55,70 % (83/164)	64,25 % (151/235)
IMMUNOCOMB VIH -1/2	50,30 % (83/165)	97,14 % (68/70)	97,64 % (83/85)	55,33 % (83/150)	64,25 % (151/235)

- VPP : Valeur prédictive positive du test ; VPN : Valeur prédictive négative du test.

Les données ci-dessous sont tirées des tableaux IX-1, IX-2 et IX-3

Statut VIH : (n = 151 ; VIH+ = 83 sujets ; VIH- = 68 sujets).

Determine : (n = 151 ; Fn = 62; FP = 13).

SD-Bioline : (n= 151 ; Fn =81; FP = 3).

ImmunoComb : (n= 151 ; Fn =82; FP = 2).

Le SD-Bioline (50,61%) et l'ImmunoComb (50,30%) ont des sensibilités semblables tandis que le Determine (57,24%) a une sensibilité légèrement plus élevée. Il en est de même pour la VPP, la VPN, l'efficacité. Pour la spécificité, c'est plutôt le SD-Bioline (95,77%) et l'ImmunoComb (97,14%) qui ont des pourcentages légèrement plus élevée par rapport à celui du Determine (83,95%).

VI.2 DISCUSSION.

Cette étude est une évaluation des tests de dépistage du VIH sur des donneurs de sang supposés être en phase de séroconversion comme décrit dans la section matériels et méthodes. Nous nous sommes intéressés à cette catégorie de donneurs pour deux principales raisons : 1) garantir une sécurité transfusionnelle maximale dans la population burkinabé ; 2) lutter contre le VIH/SIDA par la mise en place d'une stratégie efficace de diagnostic précoce de l'infection chez les donneurs de sang au CNTS en vue de leur prise en charge médicale rapide.

La taille de notre échantillon (151 plasmas) est inférieure à celle utilisée dans d'autres études : OUEDRAOGO, 2004 ; KLLINE et *al.*, 1994 ; BRATTEGAARD et *al.*, 1993 ; STETLER et *al.*, 1997 ; NKENGASONG et *al.*, 1999 ; PALMER et *al.*, 1999. Ces derniers ont utilisés respectivement 242, 547, 1185, 8283,208 sérums.

REPARTITION SUIVANT L'AGE ET LE SEXE DES DONNEURS :

La répartition suivant l'âge des donneurs de sang révèle que l'âge des donneurs est compris entre 17 - 49 ans et la tranche d'âge 18 - 23 ans est majoritaire avec 12,6 % (19 / 151) des dons. L'explication réside dans le fait que la politique de collecte mobile est plus présente dans les universités et les établissements scolaires que dans les autres groupes d'individus susceptibles de donner du sang. Cette tranche d'âge de donneurs est essentiellement jeune, plus disposée et volontaire à donner du sang.

Les donneurs de sexe masculin sont les plus représentés. La collecte comporte en effet 84 % (127/151) de donneurs de sexe masculin contre 16 % (24/151) de donneurs de sexe féminin (tableau VI). La différence de sexe observée dans les dons s'explique en grande partie par les contre-indications du don de sang chez les femmes : femmes enceintes, allaitantes ou en menstruation. A cela s'ajoute la peur que manifestent de nombreuses femmes devant le don de sang. Le sex-ratio homme/femme de notre étude est de 5,30, il est légèrement inférieure à ceux d'autres études de la sous-région (Mali) : OUEDRAOGO en 2004 (5,70), KIEMTORE en 1997 (8,37), de KIMBA en 1998 (8,22) et TRAORE en 2002 (6,83). Ces données s'expliquent par une dynamique progressive au niveau de la sensibilisation au don féminin de sang. Il ya une meilleure implication des femmes au don dans notre étude comparativement aux études des années précédentes dans les banques de sang d'autres pays africains.

CATEGORIES DE DONNEURS, TYPES DE DONNEURS ET STATUT VIH :

L'étude a révélé que sur les 151 donneurs de sang retenus, 16% (24 / 151) et 84 % (127/151) sont respectivement des donneurs non réguliers et réguliers. Les SCOLAIRES représentent le plus grand contingent de donneurs bénévoles de sang dont 92 % (48 / 52) de donneurs non réguliers et 8% (4 / 52) de donneurs réguliers. La catégorie CRTS a enregistré 72% (34/47) de donneurs non réguliers et 28% (13/47) de donneurs réguliers. Chez les SALARIES aucun donneur régulier n'a été recensé (tableau VI).

Nous avons constaté que la majorité des dons sont effectués par des donneurs occasionnels (non réguliers). Pour la plupart des donneurs non réguliers, il s'agit plus d'un dépistage que d'un don bénévole de sang. Le pourcentage observé chez les SCOLAIRES montre effectivement qu'ils sont les plus importants donneurs de sang. Cependant la majorité des donneurs réguliers viennent du CRTS. Il faudrait travailler à fidéliser plus la catégorie SCOLAIRES afin d'assurer un grand nombre de dons plus sécurisés.

Cette fidélité passera par une sensibilisation sur l'importance de ce statut de donneurs par le biais de canaux d'informations (radios, télévisions etc.) et d'association de jeunes, lieux d'enseignements et églises. Un système pourrait consister aussi par des entretiens qui serviront à convertir des donneurs dits familiaux en donneurs bénévoles réguliers puisque ceux-ci ont déjà fait ou s'apprêtent à faire un don de sang.

Les résultats types de donneurs et Statut VIH ont montré 55% (83 / 151) de Statut VIH positifs et 45% (68/151) de Statut VIH négatifs. Le CRTS a fourni 62% (29 / 47) de VIH positifs et les SCOLAIRES, 42% (22 / 52) (tableau VI). Nous avons également trouvé que le statut VIH est le même chez les donneurs non réguliers et réguliers. Le comportement face au VIH pourrait être le même dans les deux groupes d'individus. En effet pour les donneurs réguliers le risque d'infection au VIH augmente corrélativement avec le nombre de dons. Il y'a une baisse de vigilance chez les donneurs réguliers après un certains nombre de dons. Le CRTS et les SCOLAIRES sont les plus grands pourvoyeurs de sang. Il semble à travers les données que la majorité des donneurs volontaires de ces 2 catégories ont plutôt désiré faire un dépistage qu'un don de sang bénévole, ce qui explique cette répartition des taux du Statut VIH positifs.

COMPARAISON DES TESTS DE DEPISTAGE VIH :

Nous avons comparé les deux méthodes utilisées en routine au CNTS pour le diagnostic sérologique du VIH : AXSYM VIH-1 /2 Combo et ELISA (Vironostika VIH Uni Form Ag/Ab ou Vironostika plus O). Aucune discordance statistiquement significative n'a été mise en évidence entre les efficacités des deux techniques de diagnostics sérologiques (tableau VII). En effet l'ELISA a fourni autant de statut VIH+ et VIH- que l'AXSYM. Ces résultats sont en accord avec ceux du MIDAS (Microbiological Diagnostics Assessment Service) publiés entre 2001 et 2006 sur les tests combinés (LY *et al.*, 2000 ; BOURLET *et al.*, 2005). La sensibilité des tests combinés était estimée à 100% de même que la spécificité sauf pour l'AXSYM qui avait une spécificité de 99% (KWON *et al.*, 2006).

Les individus VIH positifs de notre collecte sont constitués de sujets en phase précoce de l'infection pour la plupart. Qu'en est-il de la performance des TDR sur des sujets en phase précoce d'infection à VIH ?

Sur les 151 donneurs retenus pour l'étude 83 étaient VIH statut positifs (tests combinés). Alors que les résultats des TDR pour le même statut VIH positif donnent respectivement 41% (34 / 83) ; 6% (5 / 83) et 4,60% (3 / 83) pour le Determine, le SD-Bioline et l'ImmunoComb (tableau IX-1, IX-2, IX-3). Ces pourcentages confirment une baisse de sensibilité des TDR dans la phase précoce de l'infection au VIH (L'AFSSAPS, 2008). En effet, un TDR est déclaré négatif trois (3 mois) après l'exposition et ceci signera alors une absence d'infection (SIMON, 2008). Ils sont caractérisés par la faible reconnaissance de variants viraux du VIH (non B du VIH-1 par exemple). Egalement il a été prouvé dans l'étude de DAVID *et al.*, 2000 que la trithérapie engendrait une charge virale (CVP) plasmatique inférieure au seuil de détection des tests utilisés (20 à 50 copies d'ARN_m/ ml de plasma) comme les TDR.

En transfusion sanguine la sensibilité des tests de diagnostic est une priorité. Les tests ELISA et AXSYM sont plus intéressants. Ils permettent le dépistage à grande échelle d'échantillons et sont plus long en durée d'exécution (2 heures), difficile à réaliser d'où, nécessitent un personnel qualifié, des laboratoires bien équipés et sophistiqués.

Par contre les tests rapides sont utilisés dans les dépistages unitaires. Ils sont indiqués pour un dépistage clinique rapide dans les populations de zones à forte prévalence au VIH peu développés ne disposant pas de laboratoires équipés. Pour certains de ces tests les résultats d'études antérieures viennent étayer leurs performances sur des sujets ayant déjà franchit le

cap de la séroconversion. Pour le Détermine, les études de AIDOO *et al.*, 2001 ; KOBLAVI *et al.*, 2001 ; NOGUEIRA *et al.*, 2001 et pour l'ImmunoComb FATOUMATA M.T ,2004.

REPARTITION SELON LES CO-INFECTIONS (VHB, VHC, SYPHILIS) :

La recherche d'autres marqueurs sérologiques autres que le VIH chez les donneurs a révélé la présence du VHB, du VHC et de la syphilis. La séroprévalence à l'hépatite B est de 91% (20/22) et 9 % (2/22) respectivement chez les donneurs non réguliers et réguliers (tableau X-1). Ceci est en partie dû au mode de transmission de l'hépatite B (voie parentérale, salive etc.). 75% (6/8) et 25% (2/8) respectivement des donneurs non réguliers et réguliers avaient le VHC et un seul sujet donneur non régulier souffrait de la syphilis.

Notre travail confirme que quel que soit le type de donneurs ceux-ci sont caractérisés par une fréquence de marqueurs infectieux VHB, VHC, SYPHILIS. L'étude de BATINA *et al.*, 2007 a également révélé la présence dans la population en plus du VIH de ces trois infections majeurs. Nous trouvons une prévalence en VHB plus élevée chez les donneurs non réguliers comparés aux donneurs réguliers cette prévalence est identique dans les deux groupes pour le VHC.

De même, aucune différence n'a été trouvée entre le statut VIH et les co-infections recensées. Une différence bien que peu significative a été trouvée au niveau de la co-infection VHB/VIH (tableau X-2). Les deux catégories de donneurs étudiés sont caractérisés par une fréquence de marqueurs infectieux tels que : VHB, VHC et SYPHILIS. La présence d'un de ces marqueurs chez un donneur régulier représente une perte pour la banque de sang.

TEST DE CONFIRMATION (RT/PCR) :

La RT/PCR, utilisée comme élément de diagnostic de la primo-infection, est l'un des tests les plus fiables et standardisés pour dépister l'infection au VIH (DENIAUD *et al.*, 2002). Son efficacité a été démontrée dans le cadre du diagnostic précoce de l'infection à VIH. 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.

Cette technique a été utilisée par plusieurs auteurs pour détecter soit l'ARN, ou l'ADN viral (MAO-YUAN *et al.*, 2002; LALLEMANT *et al.*, 2005; SIMPORE *et al.*, 2006.).

Les résultats obtenus par la RT/ PCR sur les pools de plasmas de donneurs ont été identiques à ceux des deux techniques de l'ELISA et de l'AXSYM tous tests de quatrième génération (tests combinés).

Nous avons préparés 24 pools de 5 échantillons chacun avec le plasma de 120 donneurs supposés être en phase de séroconversion ou en primo-infection. Les pools analysés comportaient pour l'ELISA (n=18 ; VIH+ = 5 ; douteux = 5 ; VIH- = 8) et l'AXSYM (n = 6 ; VIH+= 3 ; douteux = 1 ; VIH- = 2). Deux kits d'extraction ont été utilisés à savoir le kit analytikjena et Qiagen.

L'amplification par la RT/PCR a permis de confirmer positifs , 8 pools positifs sur 24 (tableau XI).Les pools amplifiés (RT/PCR) ont donné pour :

- **L'ELISA** : PCR+ = (5 pools de VIH+ et 4 pools de douteux) ;
PCR- = (0 pool de VIH+, 1 pool de douteux et 8 pools de VIH-).
- **l'AXSYM** : PCR+ = (3 pools de VIH+, 1pool de douteux et 0 pool de VIH-) ;
PCR- = (0 pool de VIH+, 0 pool de douteux et 2 pools de VIH-).

Nous avons analysé individuellement à la RT/PCR, 30 échantillons provenant de 6 pools négatifs. Les échantillons ont tous été confirmés négatifs par la reprise. Ensuite 10 de ces échantillons ont subit un contrôle de qualité par la PCR en temps réel et aucune copie de virus n'a été détecté (Seuil de détection <40 copies/ml). Nous avons confirmé négatif à la RT/ PCR du VIH-1, 1 pool de douteux soit 4,16 % (5/120) des échantillons. Le bilan net est un gain de 5 poches de sang, une fois que la séronégativité au VIH-2 et aux autres co-infections de ces échantillons auraient été prouvés.

PERFORMANCES DES TESTS :

Les valeurs prédictives d'un test rendent compte mieux de sa validité dans une population donnée. La sensibilité, la spécificité et l'efficacité sont des critères importants dans le choix d'un test.

L'AXSYM et l'ELISA sont des tests combinés dits de quatrième génération utilisés dans le diagnostic du VIH. Ces tests sont capables de détecter aussi bien les anticorps produits contre le VIH que l'antigène p24 du virus qui marque la présence précoce de la particule

virale. Ils sont indiqués pour dépister les dons de sang. Ils ont une grande sensibilité sur les échantillons avec séroconversion précoce.

L'ELISA a donné des résultats performants par des valeurs prédictives négatives de 100%.

Quant à l'AXSYM, la sensibilité a donné 100 % ; mais le nombre réduit d'échantillons nous a pas permis de calculé la valeur prédictive négative (VPN). Par contre l'ELISA a eu une valeur prédictive positive (90%), une sensibilité (90%) et une efficacité (94,74%) plus basses que celles de l'AXSYM. L'AXSYM (100%) s'est avéré être plus plus spécifique que l'ELISA (90%). En effet la production d'échantillons douteux par l'AXSYM est plus faible que par l'ELISA. Cependant au CNTS la disponibilité des réactifs favorise plus l'utilisation de la technique ELISA par rapport à celle de l'AXSYM.

TESTS RAPIDES (STATUT VIH COMME TEST DE CONFIRMATION) :

Le calcul des performances des tests rapides par rapport au statut VIH comme test de confirmation a montré que :

Le Determine, le SD-Bioline et l'ImmunoComb ont eu des performances faibles. Les valeurs prédictives positives ont donné 86,46% ; 96,51% et 97,64 % respectivement pour le Determine, SD-Bioline et l'ImmunoComb.

Le Determine est relativement le plus sensible ($Se=57,24\%$) des 3 tests utilisés. Le SD-Bioline ($Sp= 95,77\%$) et l'ImmunoComb ($Sp=97,14\%$) sont plus spécifiques que le Determine (83,95%).Globalement les performances des 3 tests rapides confirment leur manque de sensibilité sur des sujets en séroconversions.

L'AFSSAPS, en 2005-2006 lors d'un contrôle a estimé que le taux global de reconnaissance des séroconversions des tests rapides se situait entre 30-68 % selon la trousse. Les tests rapides ne sont donc pas efficaces sur les donneurs en primo-infections.

L'OMS préconise pour un test une Sensibilité de 99% et une Spécificité de 99%. L'ELISA a eu une spécificité de 90 % et l'AXSYM 100% .Quant à la sensibilité toutes les 2 techniques ont donné 100 %.

Pour une meilleure sécurité transfusionnelle et un diagnostic fiable chez les donneurs, nous recommandons l'utilisation de la RT/PCR.

La prévalence du VIH dans une banque de sang est élevée car la marge de sensibilité des tests utilisés l'est également. La RT/PCR permet la mise en place d'une stratégie de dépistage sérologique qui combine sensibilité et spécificité. La banque de sang (prévalence élevée)

pourrait devenir un centre sentinelle en matière de lutte contre le VIH/SIDA. Ce serait effectivement un apport non négligeable dans l'établissement des données épidémiologiques sur le VIH. Puisque d'une part les donneurs sont tous volontaires et d'autres parts le CNTS pourrait fournir des taux de prévalences au VIH fiables et représentatif des taux de la population générale.

La sensibilité exigée en transfusion sanguine varie fortement en fonction du type de virus. L'application de la RT/PCR au niveau des pools de plasma et l'élimination des pools contaminés permettent de garantir une sécurité virale maximale compatible avec les critères de sécurité transfusionnelle dans une banque de sang. Le nombre de tests est réduit, ce qui diminue fortement les coûts. Cependant, la perte engendrée par la destruction d'un pool à grand effectif est importante d'un point de vue économique et éthique (perte d'un grand nombre de dons non infectieux). L'idéal serait bien sûr de tester des pools à effectif réduit pour éviter ces pertes et poser un bon diagnostic VIH.

Les tests effectués sur des pools à petit effectif permettent de réduire le nombre de tests à effectuer sans trop affecter la sensibilité (dilution des échantillons). La sensibilité du test à utiliser et la taille des pools doivent être établis en fonction du type d'agent à rechercher. Différentes tailles de pools (8 à 500), différents systèmes de pooling (2, 3 dimensions) ont été développés et testés (THOMAS, 2004). Chaque pool trouvé positif doit être résolu pour identifier le don responsable de la contamination. Cela permet d'envisager l'utilisation de la RT/PCR en analyse de routine en transfusion sanguine. Car le seul obstacle qui se présentait à l'emploi de cette technique était le coût élevé de sa réalisation et son efficacité sur des dilutions d'échantillons (pools).

La RT/PCR sur les dons individuels permettrait l'élimination directe des dons contaminés et la notification rapide aux donneurs. Actuellement pour des raisons de coûts et de logistique, ces tests individuels ne sont pas encore applicables en routine sur de grandes quantités d'échantillons.

Malgré les énormes progrès médicaux aucun produit biologique ou de synthèse ne peut remplacer les produits sanguins labiles. Il faudrait pousser sans cesse les possibilités de diagnostic précoce du VIH et autres virus transmissibles par le sang. La RT/PCR est la technique la plus précise afin de garantir une sécurité maximale et freinée l'expansion de la pandémie du VIH/SIDA.

VII-CONCLUSION ET PERSPECTIVES.

VII.1 CONCLUSION

La recherche d'une sécurité maximale en transfusion sanguine passe par le diagnostic précoce des principales maladies virales susceptibles d'infecter le receveur. Les tests combinés (tests de 4^{ème} génération) sont nettement plus appropriés que les tests de dépistages rapides pour dépister des primo-infections à VIH sur des dons de sang. La population de donneurs est également caractérisés par d'autres types d'infections tels que : le VHB, le VHC et la syphilis.

L'emploi des tests de dépistages rapides dans les pays en voie de développement surtout dans les régions où l'accessibilité à des techniques modernes est difficile est un recours efficace dans le suivi biologique de l'infection à VIH. Cependant ces tests doivent être constamment améliorés pour parfaire leurs efficacités surtout dans les cas d'infections précoces.

La RT/PCR ou la réaction de polymérisation en chaîne associée à une transcription inverse (RT/PCR) est une technique de dépistage du VIH plus sensible que les tests combinés et son efficacité aujourd'hui a été prouvée par plusieurs auteurs. La faisabilité de cette technique sur des pools d'échantillons provenant de donneurs s'est avérée efficace et moins coûteuse. On pourrait dorénavant envisager son utilisation en analyse de routine au CNTS. Au Burkina Faso comme dans d'autres pays en voie de développement, le diagnostic précoce de l'infection est une voie certaine pour freiner l'expansion de l'épidémie du VIH/SIDA.

VII.2 PERSPECTIVES.

Comme perspectives, c'est encore améliorer la sécurité en transfusion sanguine en prolongeant l'étude déjà menée sur d'autres types de virus présents chez les donneurs de sang comme le VIH-2, le virus de l'hépatite B, de l'hépatite C, les Herpesviridae ou sur la transmission du paludisme en transfusion sanguine.

Nous pourrions faire une évaluation de la performance de séroconversion des tests ELISA combinés sur des échantillons provenant de donneurs qui serait plus représentatifs de l'épidémiologie moléculaire du VIH au Burkina Faso et dans la sous-région.

Nous pourrions menées des études approfondies chez les donneurs de sang des primo-infections à VIH par une étude comparative entre la recherche par RT/PCR de l'ARN viral plasmatique et celle de la détection de l'ADN proviral cellulaire.

Des études pourrait également portée sur la corrélation entre l'évolution de la densité optique au spectrophotomètre lecteur de microplaque et la charge virale du VIH/SIDA dans le cas d'une infection précoce découverte chez un donneur de sang.

VIII- RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

- 1) AIDOO S, AMPOFO WK, BRANDFUL JAM, NUVOR SV, ANSAH JK et al.**
Suitability of a rapid immunochromatographic test for detection antibodies of human Immunodeficiency virus in Ghana, West Africa, *J Clin Microbiol* 2001; 39:2572-5.
- 2) AFSSPS (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé).** Annales du contrôle national de qualité des analyses de biologie médicale. Ac anti VIH (dépistage) ; Ac anti VHC ; AgHbs (dépistage et confirmation).Saint Denis. AFSSPS, 2007.
- 3) ANAES (Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé).** Janvier 2009. Service des Recommandations et Références professionnelles en 2009.
- 4) ANAES (Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé).** Janvier 2007. Stratégies du diagnostic biologique de l'infection due au VIH chez les sujets âgés de plus de 18 mois (à l'exclusion du dépistage sur les dons de sang et chez les donneurs d'organes ou de tissus). Recommandations pour la pratique clinique. Paris .ANAES ; 2000.
- 5) ANNE-DECOSTER :** Schéma du VIH-1. <http://www.anne-decoster.free.fr>
- 6) ASSAL A., COSTE J., BARLET V., LAPERCHÉ 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*, vol.10, issue3, pp.217-226.
- 7) BATINA A., KABEMBA S., MALENGELA R, 2007.** Marqueurs infectieux chez les donneurs de sang en république démocratique du Congo(RDC).CPTS/ISTM/CUK, Rev Med Brux-2007.
- 8) BARIN F., DENIS F., BAILLOU A., LEONARD G., M'BOUK S., GERSHYDAMETG M., SANGARE A., KANKI P., ESSEX M.** A STLVIII related human retrovirus, HTLV-IV: analysis of cross reactivity with the human immunodeficiency virus. *J. Virol. Methods*; 1987, 17:55-61
- 9) BELAN A. G., CHAPLAIN C., A. BOUSSAIRI, 2008.** Suivi biologique de l'infection à VIH chez l'adulte *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* Volume 23, Issue 2, April 2008, Pages 95-102.

- 10) BOUVET E., ROUVEIX E. 2005.** Transmission sanguine du VIH, (GERES).
- 11) BOURAMA T.** Résultats épidémiologiques de l'utilisation de cinq techniques de dépistage du VIH au CNTS de Bamako. Thèse pharma. 2002 ; Bamako Mali.
- 12) BOURLET T., PRETIS C., PILLET S., LESENECHAL M., PICHE J., POZZETO B., 2005.**Comparative evaluation of the VIDAS HIV DUO ultra assay of combined detection of HIV-1 antigen and antibodies to HIV. *J Virol Methods* 2005; 127(2): 165-7.
- 13) BUSCH MP., WATANABE K.K., SMITH J.W., HERMANSEN S.W., THOMSON. 2000.** RA for the Retrovirus Epidemiology Donor Study.False negative testing errors in routine viral marker screening of blood donors. *Transfusion* 2000; 40:585-9.
- 14) BRATTEGAARD K, KUADIO J, ADOM M-L , et al.** Rapid and simple screening and supplemental testing for HIV-1 and HIV-2 infection in west Africa. *AIDS* 1993, 7: 883-885.
- 15) CNLS-IST (Conseil National de Lutte contre le SIDA et les IST), 2009.** 8ème session ordinaire Janvier 2009, Bilan Général de la mise en œuvre du plan national multisectoriel de lutte contre le VIH et les IST (PNM) de l'année 2008. www.cnls.bf/
- 16) CHAPLAIN C., BELAN A. G., 2006.** Suivi biologique de l'infection VIH : intérêt du génotypage pour la résistance et du dosage des antirétroviraux. *Spectra Biologie n°151*, Avril 2006.
- 17) COUROUCE AM., PILLONEL J ET LES GROUPES DE TRAVAIL RETROVIRUS ET HEPATITES VIRALES DE LA SOCIETE FRANÇAISE DE TRANSFUSION SANGUINE., 1997.**Risque de transmission d'infections virales par transfusion des dérivés sanguins labiles.*Médecine thérapeutique* 1997 ; 3 :858-62.

18) CORNILLOT C., MERCIER B., 2000. Etude Nationale de faisabilité. Etablissement Français du Sang. Rapport final, juin 2000.

19) COSTE J., DEFER C., SAURA C., 2000. Routine experience and future developments in virus NAT applications. *Molecular Biology in Blood transfusion*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000; 105-10.

20) COSTE J. *Revue Médical Suisse*. Apport du dépistage génomique viral dans la sécurité transfusionnelle. *Hématologie* N°2344. revue.medhyg.ch.

21) DEHEE A., 2003, Les différentes techniques de quantification des génomes viraux. *Revue Française des Laboratoires* Volume 2003, Issue 351, Pages 23-29 doi:10.1016/S03389898(03)733812. <http://www.sciencedirect.com/science/journal/03389898>

22) DENIAUD F. ET MELMAN C., 2002. De l'appréhension des maladies sexuellement transmissibles à la prévention du VIH. *La Presse médicale* 2002, vol. 31, n°9, pp.387-392.

23) DAVID D., THEZE J., 2000. Infection à VIH et immunothérapie associée.

24) DURAND F., DANIC B., TARDIVEL R., ET AL., 2000. Découverte d'une infection chronique par le VHC sans séroconversion chez un donneur de sang en France pendant 28 mois. *Transfusion clinique et Biologique* 2000 ; 7 :242-50.

25) FATOUMATA M T. Dépistage du VIH à partir de confetis de sang total sur papier filtre Validation d'un algorithme utilisant des tests rapides .Thèse Pharm.2004 ; Bamako ; Mali.

26) 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 Med.* 118:13-21, 1999.

27) **GARRAIT V., MOLINA J. M., 2001.** Nouvelles stratégies de traitement antirétroviral chez les patients infectés par le VIH. *Pathologie Biologie* Volume 49, Issue 1, February 2001, Pages 67-71.

28) **GENES DE STRUCTURES DU VIH-1/ 2 : GILLES FURELAND ET BENJAMIN PAVIE.** [Http://www.snv.jussier.fr/vie/SIDA/images](http://www.snv.jussier.fr/vie/SIDA/images).

29) **GIRARD P M, Ch.KATLAMA, G.PIALOUX.** VIH EDITION 2001 Doin ; Paris 542 pages.

30) **HU DALEJ.,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* ISSN 0269-9370.2001, vol. 15, n°6, pp. 683-691.

31) **INSTITUT PASTEUR.,** Découverte du SIDA 1983.

32) **THOMAS I., 2002.** Thèse doctorat en sciences vétérinaires ,2002 . service de virologie ; Institut scientifique de sante publique.

33) **KABA K., 2004.** Sécurité transfusionnelle en Afrique.2004 NG COM Santé Tropicale.com.

34) **KLIMKAIT T., 2008.** Test VIH. *Nova: Forum Med Suisse*; 8(15):278-281.

35) **KLLINE RL. , DABA A., BLATTNER W. QUINN TC.** Diagnosis and differentiation of HIV-1 and HIV-2 Infection by two rapid assays in Nigeria. *J Acquir Immune Defic Syndr*,1994 ; 76 : 623 – 26 .

36) **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. *Anal Chem.* 2009 Feb 17.

37) KIMBA H. Enquête épidémiologique sur l'infection à VIH chez les donneurs de sang à Bamako Thèse pharma. 1999 ; Bamako ; Mali.

38) KIEMTORE P.M.N.G. Les anticorps antitoxoplasmiques chez les donneurs de sang et les malades atteints de SIDA à Bamako. Thèse pharma. 1998 ; Bamako ; Mali.

39) KOBLOVI- DEME S , MAURICE C, YAVO D, SIBAILLY TS , WIKTOR ZS et al. Sensibility and specificity of human immunodeficiency virus ,rapid serologic assays and testing algorithms in antenatal clinic in Abidjan, Ivory coast . J Clin Microbiol 2001, 39:808-12.

40) KWON J A., YOON S.Y., LEE C.K., LIM C.S., LEE K.N., SUNG H.J., et al.,2006. Performance evaluation of three automated human immunodeficiency virus antigen-antibody combination immunoassays. J Virol Methods 2006; 133(1): 20-6.

41) 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. *M/S n° 1*, vol. 21, janvier 2005.

42) LAUNAY O., 2008. Thérapeutiques antirétrovirales : principes du traitement de l'infection par le VIH *La Presse Médicale*, Volume 37, Issue 6, Part 2, June 2008, Pages 1022-1032.

43) LY TD., EDLINGER C., VABRET A., 2000. Contribution of combined detection assay of p24 antigen and anti-human immune deficiency virus (HIV) antibodies in diagnosis of primary HIV infection by routine testing. J Clin Microbiol 2000; 38(6):2459-61.

44) 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). *Medicine d'Afrique*: 1992, 39 (2).

45) MULLIS KB., FALOONA F.A.,1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction .*Methods in enzymology* 1987; 155:335.

46) 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*, Oct. 2002, p. 3805–3809 Vol. 40, No. 10.

47) NOGUEIRA SA, LAMBERT JS, ALBUQUERQUE AL, RADRIGUES R. REISS. BORNIA R et al. Assessment of a rapid HIV test strategy during labor: a pilot study from Rio de Janeiro, Brazil. *J Hum Virol* 2001;76:278-82.

48) NUBLING C.M., WILKOMMEN H., LOWER J., 1995. Hepatitis C transmission associated with intravenous globulins. *Lancet* 1995; 345:1174.

49) NKENGASONG J N, MAURICE C, KOBLAVI S, et al. Evaluation of serial and parallel serologic testing algorithm in Abidjan , Ivory Cost. *AIDS* 1999; 13: 109-117

50) OMS (Organisation mondiale de la Santé) . Relève épidémiologique hebdomadaire, 21 mars 1997.

51) OMS (Organisation mondiale de la Santé) . HIV Diagnostic. [www.who.int/bct./Main](http://www.who.int/bct/Main) areas of Works/BTS/HIV Diagnostic/Evaluation.

52) ONUSIDA/OMS Situation Mondiale de l'épidémie à VIH. Décembre 2002.

53) ONUSIDA (Programme des Nations Unies sur le VIH/SIDA), 2007. Situation Mondiale de l'épidémie à VIH.

54) OUEDRAOGO H.W. Thèse de Pharmacie 2004 -Evaluation des performances de sept tests de dépistage du VIH utilisés au CNTS de Bamako

55) PALMER CJ. DUBON JM, KOENIG E, et al. Field evaluation of Determine HIV1/2 rapid human immunodeficiency virus diagnostic test in Honduras and the domican republic. *Journ of clinic Microb*, (111999; 37): 3698-700.

- 56) PCR : les différentes étapes** (F-CHUPS-virologie-DCEM1).www.chups.jussier.fr
- 57) PLANTIER J.-C., SIMON F 2002.** Diagnostic sérologique des infections à VIH. *Développement et Santé*, n°162, décembre 2002.
- 58) RAFFI F., 1999.** Actualités sur le VIH-1 (Mars 1999).
- 59) REVILLARD J. P., Association des enseignants d'immunologie de langue française Collaborateur enseignants de l'ASSIM, 2001.** Immunologie. Edition: 4 Publié par De Boeck Université, 2001 ISBN 2804138054, 9782804138059 600 pp.
- 60) REVERSE TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR).** <http://www.pcrstation.com/rt-pcr/>
- 61) REYNIER P., Malthièry Y., 1996.** PCR longue: progrès récents et application à l'étude des délétions de l'ADN mitochondrial. *Médecine/sciences* 12 :1011-6.
- 62) SANOU P. T., 1999.** Données Epidémiologiques et Luttés contre le SIDA au BURKINA FASO. (CERBA).
- 63) SCHNEIDER V., 2003.** Quantification génomique: applications aux infections par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV). *Revue Française des Laboratoires*, Volume 2003, Issue351, Pages31-34. doi:10.1016/S0338-9898(03)73382-4
<http://www.sciencedirect.com/science/journal/0338>
- 64) SCHREIBER G.B., BUSCH M.P., KLEINMAN S.H., KORELITZ J.J., 1996.**The risk of transfusion transmitted viral infections. *N Engl J Med* 1996; 334:1685-90.
- 65) SIMPORE J., 2006.** Manipulation génétique de la vie et éthique de la recherche, via delle calanziane, 64.Rome 2006.

66) 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 Center in Burkina Faso. *J Med Virol.* 2006 Feb; 78(2):148-52.

67) SIMON F., 2008. Les tests rapides pour le dépistage VIH. Laboratoire de Microbiologie CHU Saint Louis de Paris.2008.francois-simon@sls.aphp.fr.

68) STETLER HC , GRANADE TC , NUEZ CA, et al. Field evaluation of rapid HIV – 1 infection in Honduras. *AIDS*, 1997; 11: 369 -375

69) THEZE J., 2008.CD4 lymphocytes as targets and actors in the pathogenesis of HIV infection--therapeutic implications. *Bull Acad Natl Med.* 2008 Oct; 192(7):1453-66.

70) TREMBLAY J.M., Infectiologie et Biologie du VIH-1.Centre de recherche en infectiologie du CHUL (CHUQ). <http://cri.crchul.ulaval.ca/uhiv/>.

71) TAMALET C., GROB A., 2009.Les Trousses de Dépistage VIH: Fiabilité des tests rapides. AP-HM et CG 13.

72) TUBIANA R. AND KATLAMA C., 1997. Les traitements antirétroviraux. *Médecine et Maladies Infectieuses* Volume 27, Issue 1, January, Pages 23-30.4

73) WAPEDIA-WIKI. Réaction en chaîne par polymérase. <http://wapedia.mobi/fr>.

74) WATSON J. D., GILMAN M., REVELANT O., WITKOWSKI J., ZOLLER M., 1994. ADN recombinant. De Boeck-Wesmael S.A., Bruxelles. ISBN 2804115976-9782804115975, 642pp.

75) [www.wikipedia.fr\replication du VIH.](http://www.wikipedia.fr/replication%20du%20VIH)

ANNEXES.

ANNEXE 1 : REACTIFS LES PLUS UTILISÉS AU NIVEAU NATIONAL.

- **TESTS DE DEPISTAGE**

1- ELISA (Enzyme Lynked Immuno Sorbent Essay) :

- Geenscreen Plus (BIO-RAD)
- Murex Ag –Ab Combination (Abott)
- Vironostika (Biomérieux)

2-Unitaires rapides (tests rapides)

2-1- Non discriminants :

- Determine (Abott), Unigold

2- 2 – Discriminants :

- Immunocombs (Bispot) VIH-1/2 (Orgenics), SD-BIOLINE VIH-1/2 de STANDARD DIAGNOSTICS, INC.

3-Automates ELISA / réactifs associés :

- ABott
- Biomerieux

4-TESTS DE CONFIRMATION:

- Western-Blot, INNO-LIA

Le choix des présents réactifs est basé sur les recommandations de l’OMS, de l’Agence Française d’Accréditation et d’Evaluation en Santé et l’étude d’évaluation de tests unitaires rapides en République du Sénégal et des conclusions issues de notre étude.

***NB :** D’autres tests peuvent être admis à la lumière de leur autorisation internationale de mise sur le marché, sous réserve du résultat de leur évaluation technique par les structures compétentes au niveau national.*

ANNEXE 2 : CONDUITE A TENIR DEVANT L'INTERPRETATION D'UN WB-VIH-1.

✓ Positivité certaine

Au minimum 2 Ac anti-«env »

(anti-gp120 et anti-gp160)

Et

1 Ac anti-« gag » ou anti-« pol »

- Deuxième prélèvement demandé immédiatement pour s'assurer qu'il n'y a pas eu d'erreur de prélèvement ou de contamination du 1er échantillon.

- Si réaction sur les protéines issues des gènes « g « gag » et/ou « pol » de forte intensité par rapport aux protéines issues des gènes « env », faire une sérologie VIH-2 et envisager une infection due au VIH-1 de groupe O.

✓ Positivité probable

a) 1 Ac anti-p24

Et

1 Ac anti-gp160

- Si aucune évolution et WB-VIH-2 négatif : faux positif probable (exceptionnel) ou VIH-1 de groupe O (profil rare).

- Si aucune évolution et WB-VIH-2 positif : séropositivité VIH-2 (profil rare).

b) 2 Ac anti- « env »

(anti-gp120 + anti-gp160)

. Nouveau prélèvement nécessaire 1 à 2 semaines plus tard :

- Si prélèvement négatif : contamination du 1er échantillon ou erreur d'identification

- Si une évolution est observée : séroconversion VIH-1 (profil rare)

- Si pas d'évolution et WB-VIH-2 positif : séropositivité VIH-2 (profil rare)

- Si une évolution est observée : séroconversion VIH-1

Ce profil peut également être observé en cas de sida à un stade tardif.

✓ **Profils à contrôle**

Ac anti-gp160 isolés

Ac anti-p24 isolés

(+/- anti-p55)

Ac anti-p34 isolés

(+/- anti-p24)

. Faire une sérologie VIH-2 surtout si les 2 techniques de dépistage sont franchement positives

. Demander un nouveau prélèvement 1 à 2 semaines plus tard.

. Si pas d'évolution et VIH-2 négatif : fausse réaction positive ou variant du VIH-1 (exceptionnel).

✓ **Négativité**

Ac anti-p17

Autres profils non

considérés

Aucun Ac

L'absence de réactivité sur le WB associée à des résultats positifs francs avec les techniques de dépistage doit faire envisager un début de séroconversion. Un nouveau prélèvement 1 à 2 semaines plus tard est alors nécessaire.

Protéines issues des gènes : « env » : gp 160, gp120, gp41 ; « gag » ; « pol ».

ANNEXE 3 : LES MARQUEURS BIOLOGIQUES DE L'INFECTION DUE AU VIH / TERMINOLOGIE DES ANALYSES DE DETECTION DES AC-ANTI-VIH (*tiré du document des Stratégies du diagnostic biologique de l'infection due au VIH chez les sujets âgés de plus de 18 mois (à l'exclusion du dépistage sur les dons de sang et les donneurs d'organes ou de tissus) l'Agence Nationale Française d'Accréditation et d'Evaluation en Santé - 2000.*

Cinq marqueurs peuvent être actuellement utilisés pour le diagnostic biologique d'une infection due au VIH :

- l'ARN-VIH plasmatique (ARN-VIH) ;
- l'antigène p24 (Ag p24) ;
- les anticorps (Ac) anti-VIH (Ac anti-VIH) ;
- l'ADN proviral (ADN) ;
- l'isolement du virus.

1- L'ARN-VIH plasmatique

La recherche de l'ARN plasmatique du VIH-1 est actuellement possible avec les outils biologiques commercialisés. Sa présence dans le plasma témoigne de la réplication virale dans l'organisme.

L'ARN-VIH plasmatique est le marqueur détectable le plus précocement lors de la primo-infection : 8 à 17 jours (en moyenne 10 jours) après la contamination. Le taux d'ARN-VIH (« charge virale ») est variable et peut atteindre des valeurs élevées : jusqu'à 10^6 - 10^7 copies par ml de plasma.

2 - L'antigénémie p24

Seule la recherche de l'Ag p24 du VIH-1 est actuellement possible avec les outils biologiques commercialisés. L'Ag p24 est un marqueur direct de l'infection.

Détectable dans le sérum ou dans le plasma entre le 12^{ème} et le 26^{ème} jour après la contamination (en moyenne 15^{ème} jour), l'Ag p24 est mis en évidence plus tard que l'ARN-VIH plasmatique (4 à 9 jours plus tard).

L'Ag p24 est détectable seulement lorsque la charge virale est de l'ordre de 10^4 copies d'ARN-VIH par ml de plasma. Il s'agit d'un marqueur transitoire, qui réalise un pic d'une durée moyenne d'une dizaine de jours entre le 20^{ème} et le 30^{ème} jour après la contamination.

Comme pour l'ARN-VIH, le schéma de cette cinétique est probablement variable d'un sujet à l'autre au cours de la phase précoce de l'infection. Les études approfondies des primo-

infections, notamment asymptomatiques, sont difficiles et ces variations sont peu documentées.

1- Les anticorps anti-VIH-1 (Ac anti-VIH-1) et anti-VIH-2 (Ac anti-VIH-2).

La détection des Ac anti-VIH-1 est possible dans un délai compris entre le 20^{ème} et le 45^{ème} jour après la contamination. D'après une modélisation issue de l'analyse des observations faites à partir des cohortes de sujets exposés professionnellement, les séroconversions détectées interviendraient dans 95 % des cas moins de 190 jours après l'exposition (en moyenne 120 jours ou 3 mois) (6). Les descriptions de séroconversions tardives, même si elles sont très peu documentées recommandent de pousser le contrôle d'une contamination possible jusqu'à 6 mois.

Après leur apparition, les Ac anti-VIH sont présents pendant toute la durée de l'infection.

2- L'ADN proviral

La recherche de l'ADN proviral du VIH-1 ou du VIH-2 dans le réservoir cellulaire repose sur l'utilisation d'une technique de biologie moléculaire, la PCR (*polymérase chain réaction*). Cette technique est généralement pratiquée sur des cellules mononuclées du sang périphérique. Basée sur une technologie imposant de l'expérience en biologie moléculaire, elle est réservée à des laboratoires spécialisés dans le cadre d'indications particulières : par exemple, profils sérologiques équivoques faisant suspecter un virus variant, ou nécessité d'effectuer un diagnostic après un traitement antirétroviral institué précocement après la contamination, empêchant les autres marqueurs de se positiver.

Il n'existe pas actuellement de technique standardisée pour cette recherche, et les performances des PCR-ADN réalisées selon des techniques développées dans chaque laboratoire sont variables. Leur sensibilité peut varier de 10 à 100 % et leur spécificité de 40 à 100 %.

3- L'isolement du virus.

Il s'agit d'une technique réalisée *in vitro* par co-culture des lymphocytes du sujet suspect d'infection avec des lymphocytes provenant d'un donneur séronégatif. La détection d'une activité « transcriptase inverse » ou de l'Ag p24 dans le surnageant de culture signe la présence du virus VIH-1 ou VIH-2. Le délai d'obtention des résultats est de 10 à 30 jours.

Cette technique est réservée à des laboratoires spécialement équipés, disposant de locaux en conformité avec les normes de sécurité imposées pour ce type d'activité. Elle n'a pas sa

place parmi les examens à réaliser en pratique courante pour le diagnostic biologique d'infection due au VIH et reste un luxe pour les pays en voie de développement.

B- TERMINOLOGIE DES ANALYSES DE DETECTION DES AC-ANTI-VIH

Analyse de dépistage : analyse visant à mettre en évidence les Ac anti-VIH, sans en déterminer la spécificité. Le dépistage des Ac anti-VIH est réalisé :

- soit par des techniques ELISA
- soit par des techniques d'agglutination
- soit par des techniques dites « unitaires rapides », sur des supports de nature variable (membrane de Nylon, plastique, etc.).

Technique de dépistage mixte : technique capable de détecter à la fois les Ac anti-VIH-1 et les Ac anti-VIH-2 (Ac anti-VIH-1/-2).

Technique de dépistage simple : technique capable de détecter les Ac anti-VIH-1/-2 et ne détectant pas simultanément l'Ag p24.

Technique de dépistage combiné (par opposition à technique de dépistage simple) : technique capable de détecter simultanément les Ac anti-VIH-1/-2 et l'Ag p24.

Analyse de confirmation : analyse permettant de préciser la spécificité des Ac anti-VIH-1 ou des anti-VIH-2 présents dans le sérum étudié. La technique utilisée est soit un western-blot (WB), soit un immuno-blot (IB).