

.....  
**Faculté de Médecine de Pharmacie**  
*Faculté de* **et d'Odonto-stomatologie**

**Année universitaire 2010-2011**

## THÈSE

PARAMETRES HEMATOLOGIQUES ET  
IMMUNOLOGIQUES DANS LA TUBERCULOSE  
LATENTE CHEZ LES PERSONNES INFECTÉES PAR LE  
VIH.

**Présentée et soutenue publiquement le... /...../ 2011  
devant la Faculté de Médecine, de Pharmacie et  
d'Odonto-stomatologie**

**Par** Mr. Sylvestre TOGO

**Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie (Diplôme d'Etat)**

## JURY

**Président :**

Pr.SouleymaneDIALLO

**Membres du jury:**

- Pr. Ousmane KOITA

- Dr. Amadou KONE

- Dr Boubacar MAIGA

**Co-directeur de thèse:**

Dr. Yeya SARRO

**Directeur de thèse :**

Pr. Anatole TOUNKARA

***DEDICACES***  
***ET***  
***REMERCIEMENTS***

A la mémoire de notre petite sœur, **Marie Joséphine** qui nous a quitté trop tôt dans l'innocence de son jeune âge. Tant que dans le lit du Niger couleront ses eaux, dans nos cœurs tu vivras pour toujours.

Dors en paix Baba.

Les grands hommes de par leurs œuvres et leurs pensées ont marqué l'histoire de l'humanité. Leurs noms résistent à l'épreuve du temps et restent gravés dans la mémoire des hommes depuis des générations.

L'histoire de notre vie retiendra à jamais le nom des personnes qui en sont l'essence, le model et la référence : **notre père Jean Pierre et nos mères Elise et Rebecca.**

Votre accompagnement sans relâche et vos combats de tous les jours pour subvenir à nos besoins forcent l'admiration. Nous avons toujours été inspirés par vos valeurs humaines. Père, mères, je vous dédie ce travail qui est le résultat de l'éducation que nous avons reçue par vos soins. Fiers de vous, nous vous témoignons par ce travail toute notre reconnaissance.

Puisse la santé du corps et la longévité vous garder longtemps à nos côtés afin que nous puissions davantage apprendre de vos immenses sagesse.

Aujourd'hui plus qu'hier, nous comptons sur vos bénédictions pour aller toujours de l'avant.

Comment ne pas penser, en ce moment aussi important de notre vie à nos grands-parents qui ont accompagné nos premiers pas à l'école et qui aujourd'hui ne sont plus: **Amanigni Benoit et Yamoila Marie Joséphine.** Que vos âmes reposent en paix. Nous garderons en mémoire les conseils précieux que vous nous avez prodigués. Ce travail qui vous est aussi dédié, est le fruit de vos multiples efforts consentis dont nous nous souviendrons aussi longtemps que durera notre vie.

## **REMERCIEMENTS**

Nos remerciements vont à l'endroit de tous ceux qui de près ou de loin nous ont aidé à la réalisation de ce travail particulièrement :

**A mon oncle Amboïn Rémi, à ma tante Marie Yagalé et à leurs familles** : pour le soutien constant. Nous n'avons jamais manqué de rien tout au long de nos études universitaires. Ce travail est aussi le vôtre et trouvez en lui, l'expression de notre profonde gratitude.

**A tante Sophie et famille** : nous avons eu un début difficile et quand, sous le poids du découragement, nous avons failli abandonner, vous nous avez redonné non seulement la force de continuer mais aussi d'être beaucoup plus confiant. Sans votre aide nous n'y serons jamais arrivés. Grand merci Tata.

**A mes tantes Yatimé Madeleine, Yatanou, Simone et mon oncle Sainkadjou Yvon et leurs familles** : pour les prières et les bénédictions.

**A tous mes frères et sœurs : Anewin Moïse, Jérôme, Ampangalè, Emmanuel, Alice, Sama Nassin Aline, Amadiguin Justine, Ogobassa Odilon, Yaboïn Isabelle, Ampilema Frédéric, Anssama Bernard, Delphine, Lègnigni Antoine.** Vous avez été toujours là pour nous épauler, partager toutes nos peines et nous donner la joie de vivre. Puisse le lien de fraternité qui est la source de notre force être indéfectible et que jamais nous ne soyons désunis.

**A la famille Hubers** : pour l'accompagnement, pour le soutien matériel et financier.

**A tous les petits fils et petites filles de Amanigni Benoit.** Puisseons-nous tous ensemble tenir toujours debout la grande famille Amanigni.

**A mes amis(es) : Martin Togo, Julien Ouologuème, Ténoussé Saye, Mamadou Balam, Alpha Dicko, Rokiatou Diarra, Joseph Kodio, Samba Tolo, Youssouf Aya, Halidou Maiga, Mariam Dolo, Kharidiatou Berthé, Jean Paul Somboro.** Merci pour la joie et les peines partagées et surtout pour nous avoir appris à garder en toute circonstance le sourire signe de l'espoir.

**A ma très chère Honorine Somboro,** fidèle compagne de tout le temps. Il n'existe pas assez de mots pour exprimer combien nous te sommes reconnaissants. Nous souhaitons simplement qu'avec l'aide de Dieu, le foyer que voulons fonder soit un havre de paix, de joie et de bonheur.

**A l'Amicale pour la Promotion de la Santé (APS), l'IMCC (International Medical Cooperation Committee), l'Amicale des Etudiants en Pharmacie (AEP), la jeunesse Guina Dogon et la communauté catholique de la FMPOS.**

**A toute la promotion Moussa Harama 2004-2009.**

**A tous les anciens et nouveaux membres de l'Alliance Universitaire pour le Renouveau groupe à visage purement humain (ALLURE) ; de grande famille des Rassembleurs, Secouristes et Réformateurs (RASERE) et de la Renaissance convergence syndicale.** Jamais nous n'oublierons la confiance placée en nous pour présider à la défense des intérêts matériels et moraux des étudiants.

**A tous les membres du comité AEEM-FMPOS 2007-2008/2008-2011 et tous les étudiants de la FMPOS.** Nous avons connu les hauts et des bas sans jamais oublier notre mission principale : l'amélioration des conditions de vie et d'études des étudiants. Merci pour l'esprit de camaraderie et de synergie d'action.

« Oser lutter c'est oser vaincre » ne l'oubliez jamais.

**A mes compagnons de prison : Martin Koné, Moussa Diabaté, Kalifala Samaké, Salif Konaté, Youssouf Kanssaye.** La vie n'est pas toujours rose pour un leader et cela nous l'avons appris à nos dépens. La responsabilité avec laquelle nous avons tous assumé cette situation triste et difficile est remarquable et témoigne du courage de tout un chacun. Puisse Dieu nous préserver d'une telle situation.

**A tout le personnel du SEREFO et de l'administration de la FMPOS** pour la collaboration.

**A tous les participants à notre étude, à tous les malades du SIDA et/ou de la tuberculose.** Puisse l'espoir d'un vaccin contre le VIH ou un traitement efficace être une réalité pour le bonheur de tous.

**A tous ceux qui méritent d'être cités et qui ne l'ont pas été.** Vous êtes pour nous non moins importants. L'œuvre humaine étant imparfaite, nous vous prions de ne pas nous en tenir rigueur.

***HOMMAGES***  
***AUX MEMBRES DU***  
***JURY***

**A notre Maître et Président du jury**

**Professeur Souleymane DIALLO**

- ✓ **Professeur en bactériologie-virologie,**
  
- ✓ **Chef du service laboratoire-pharmacie de l'hôpital Gabriel Touré,**
  
- ✓ **Directeur Général du centre d'infectiologie Charles Mérieux.**

Cher Maître, c'est un grand honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury malgré vos occupations multiples.

Comme dirait l'autre, rien ne peut récompenser le mérite d'un grand Maître mais lui être reconnaissant et demeurer fidèle à ses enseignements lui procure la joie du cœur.

Cher Maître Recevez ici, notre sincère remerciement et notre profonde gratitude.



## **A notre Maître et membre du jury**

### **Professeur Ousmane KOITA**

- ✓ **Professeur en biologie moléculaire appliquée.**
- ✓ **Directeur adjoint du CEREF0/SEREF0.**
- ✓ **Directeur Général du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée à la FAST.**

Cher Maître, c'est un grand honneur que vous faites en acceptant d'être membre de ce jury.

En effet, les apports de l'homme de science que vous êtes contribueront à l'amélioration de la qualité de notre travail.

C'est ici le lieu pour nous, de vous témoigner toute notre reconnaissance pour la disponibilité dont vous faites preuve quand il s'agit de former et de transmettre vos connaissances.

**A notre Maître et membre du jury**

**Docteur Boubacar MAIGA**

- ✓ **Maître-assistant en Immunologie à FMPOS;**
- ✓ **Chercheur au MRTC;**
- ✓ **Candidat Ph D en Immunologie à l'Université Stockholm-Suède.**

Cher Maître, vous nous avez non seulement ouvert la porte de votre bureau mais aussi celle de vos savoirs en matière de science. vos qualités d'homme de science vont contribuer à l'amélioration de ce travail.

Cher maître je vous prie de bien vouloir trouver ici l'expression de tout notre respect et de notre profonde gratitude.

## **A notre Maître et membre du jury**

**Dr Amadou KONE**

- ✓ **Ph D en Biologie Moléculaire;**
- ✓ **Enseignant, chargé de cours en Biologie Moléculaire à la FAST,**
- ✓ **Assistant de Recherche au Centre de Recherche et de Formation sur le VIH et la Tuberculose (SEREFO/CEREFO).**

Cher Maître, votre rigueur dans le travail et votre modestie sont pour nous des modèles à suivre. Vous avez été toujours à écouter et toujours prêts à répondre nos sollicitations.

Sincèrement et du fond du cœur nous vous exprimons nos vifs remerciements.

**A notre Maître et Co-directeur de thèse**  
**Docteur Yeya dit Sadio SARRO**

- ✓ **Docteur en pharmacie et Master en Santé Publique,**
  
- ✓ **Epidémiologiste au Centre de Recherche et de la Lutte contre la Drépanocytose (CRLD),**
  
- ✓ **Programme manager au Centre de Recherche et de Formation sur le VIH et la Tuberculose (SEREFO).**

Cher Maître, c'est à vous que nous devons ce travail. La clarté de vos enseignements associée à la rigueur de l'homme de science que vous êtes ont permis la réalisation de ce travail.

Cher maître c'est aujourd'hui l'occasion pour nous de vous exprimer nos remerciements les plus sincères.

**A notre Maître et Directeur de thèse**

**Professeur Anatole TOUNKARA**

- ✓ **Professeur titulaire d'Immunologie,**
  
- ✓ **Responsable de l'Enseignement de l'immunologie à la FMPOS,**
  
- ✓ **Doyen de la FMPOS,**
  
- ✓ **Directeur du Centre de Recherche et de Formation sur le VIH et la Tuberculose (*SEREF*)**

Cher maître, nous vous remercions d'avoir initié et suivi ce travail. Vous nous avez fait un grand honneur en nous acceptant.

Puissiez-vous retrouver la santé du corps pour davantage œuvrer dans l'amélioration de la qualité de formation et de la culture de l'excellence que vous avez toujours prôné.

Cher maître, acceptez nos humbles remerciements pour la qualité de l'encadrement et les conseils prodigués tout au long de ce travail.

## **LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS**

# : Valeur absolue

% : Pourcentage

ADN: Acide Désoxyribonucléique

ARN: Acide Ribonucléique

BCG : Bacille de Calmette-Guérin

BK : Bacille de Koch

CCR4: CC-chemokine Receptor 4

CD : Cluster of Differentiation (grape de différenciation)

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CTL: Lymphocyte T cytotoxique (Cytotoxic T Lymphocyte)

CXCR4: CXC-chemokine Receptor

DOTS: Directly Observed Treatment Short (Court Traitement Directement Observé)

EDSVI : Enquête démographique et de Santé VI<sup>e</sup> édition au Mali

EDTA: Ethylène Diamine Tétra-acetic-Acid

ELISA : *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

Gag : Groupe Antigènes

GM-CSF: Facteur de Stimulation des Colonies de Granulocytes et de Macrophages (Stimulation Factor Colonies of granulocyte-macrophage)

Gp 160 : Glycoprotéine d'enveloppe de 160 kilodaltons

IDR : Intradermoréaction

IL : Interleukine

IFN- $\gamma$  : Interféron- $\gamma$

LB : Lymphocyte B

LT : Lymphocyte T

*M. tuberculosis* : *Mycobacterium tuberculosis*

NIH : National Institutes of Health

NK : Natural Killer

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONUSIDA : Organisation des Nations Unies pour la Lutte contre le SIDA.

POL: Polymérase

PPD : Dérivé de Protéine Purifié (Purified Peptide Deriveted)

SIDA : Syndrome d'Immunodéficience Acquis

TB : Tuberculose

TDC: Taux de Détection des Cas

Th : Lymphocyte T auxiliaire (T-helper)

TNF $\alpha$  : Facteur de Nécrose Tumorale (Tumor Necrosis Factor)

VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine.

## SOMMAIRE

<b>1. Introduction.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Objectifs.....</b>	<b>4</b>
<b>3. Généralités.....</b>	<b>5</b>
<b>3.1. La Tuberculose.....</b>	<b>5</b>
<b>3.1.1. Epidémiologie.....</b>	<b>5</b>
<b>3.1.2. Physiopathologie :.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1.2.1. La tuberculose latente.....</b>	<b>8</b>
<b>3.1.2.2. Réponse immunitaire à l'infection par le <i>M. tuberculosis</i> ......</b>	<b>10</b>
<b>3.1.2.3. Diagnostic de la tuberculose latente.....</b>	<b>11</b>
<b>3.1.2.4. L'hypersensibilité de type IV, ou hypersensibilité retardée.....</b>	<b>13</b>
<b>3.2. Infection par le VIH.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2.1. Epidémiologie.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2.2. Le virus de l'immunodéficience humaine VIH.....</b>	<b>15</b>
<b>3.2.2.1. Taxonomie.....</b>	<b>15</b>
<b>3.2.3. Mode de transmission.....</b>	<b>17</b>
<b>3.2.4. Aspect clinique de l'infection par le VIH.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2.5. Traitement.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2.6. Les réponses immunitaires contre l'infection par le VIH.....</b>	<b>21</b>
<b>3.3. La co-infection VIH/Tuberculose latente :.....</b>	<b>23</b>
<b>3.4. Les paramètres hématologiques et immunologiques.....</b>	<b>24</b>



<b>4. La méthodologie :</b> .....	<b>30</b>
<b>5. Les résultats:</b> .....	<b>36</b>
<b>5.1. Données socio-démographiques</b> .....	<b>36</b>
<b>6. Discussion</b> .....	<b>50</b>
<b>6.1. La méthodologie utilisée</b> .....	<b>51</b>
<b>6.2. Les résultats obtenus</b> .....	<b>51</b>
<b>7. Conclusion et recommandations</b> .....	<b>57</b>
<b>7.1. Conclusion :</b> .....	<b>57</b>
<b>7.2. Recommandations:</b> .....	<b>57</b>
<b>8. Bibliographie :</b> .....	<b>58</b>
<b>9. Annexes</b> .....	<b>72</b>

## **1. Introduction**

Au Mali il y'a eu de nombreux travaux sur le plan clinique, épidémiologique et socio-comportemental en matière de VIH et la tuberculose.

Le rapport 2010 de l'ONUSIDA (1) a rapporté qu'en 2009, le nombre de personnes nouvellement infectées par le VIH était estimé à 2,6 millions de cas. Ce chiffre est inférieur de près d'un cinquième (16 %) du nombre de personnes nouvellement infectées en 1999 (3,1 millions) et de plus d'un cinquième (18 %) du nombre estimé de personnes infectées (3,2 millions) en 1997, année où le nombre de nouvelles infections a atteint son pic.

Dans 33 pays (dont 22 sont en Afrique subsaharienne), l'incidence du VIH a diminué de plus de 25 % entre 2001 et 2009 (1). En Afrique subsaharienne où l'on continue d'enregistrer la majeure partie des nouvelles infections, on a estimé à 1,8 million le nombre de personnes contaminées en 2009. Ce chiffre est nettement inférieur à celui estimé en 2001 avec environ 2,2 millions de nouveaux cas dans cette même région. Cette tendance traduit la combinaison de différents facteurs, notamment l'impact des efforts de prévention et l'évolution naturelle de l'épidémie du VIH.

Au Mali, le taux de séroprévalence est de 1,3% selon l'Enquête Démographique et de Santé (EDS IV) de 2006. Selon les résultats de la dernière étude de séroprévalence de l'infection à VIH réalisée dans la population générale adulte, le Mali pourrait être considéré comme un pays à faible prévalence (2).

En 2009 également, le rapport 2010 de l'OMS (3), relatif à la lutte contre la tuberculose estimait à 9,4 millions de cas de tuberculose. La prévalence est estimée à 14 millions et la mortalité à 1,3 millions chez les VIH négatifs et 380 000 chez les VIH positifs, dont 35 % des cas constatés dans les régions africaines. Il est estimé que les VIH-positifs représentent entre 11 et 13% de l'ensemble des nouveaux cas de TB.

Mais jusqu' à présent, qu'il s'agisse de pays en voie de développement comme le Mali ou de pays développés, il existe encore de nombreux éléments mal connus lorsqu'on se place sur le plan des mécanismes de défense de l'organisme dans la tuberculose latente associée au VIH. Y a-t-il des paramètres hématologiques et ou immunologiques pouvant expliquer la latence de la Tuberculose associée ou non à l'infection à VIH ?

A notre connaissance, il n'y a toujours pas une réponse satisfaisante à cette question. C'est pourquoi nous avons voulu entreprendre cette étude pour comparer différentes populations d'individus infectés et non infectés par le VIH au regard du statut de leurs IDR.

## **2. Objectifs**

### **2.1. Objectif général :**

- Explorer les paramètres hématologiques et immunologiques dans la tuberculose latente associée à l'infection par le VIH.

### **2.2. Objectifs spécifiques :**

- Déterminer les valeurs des paramètres hématologiques à partir de l'hémogramme chez les tuberculeux latents associés ou non à l'infection par le VIH.
- Déterminer les pourcentages et les valeurs absolues des cellules T, B, NK et NKT par la cytométrie de flux.
- Comparer les valeurs des paramètres hématologiques et immunologiques qui ont été déterminés entre les différents groupes d'étude.

### **3. Généralités**

#### **3.1. La Tuberculose**

La tuberculose est une maladie infectieuse et contagieuse provoquée par des bacilles appartenant au complexe *tuberculosis*. Elle constitue un problème majeur de santé publique car elle est une maladie redoutable qui a causé environ 1,7 million de décès en 2009 dans le monde selon l’OMS. (3)

La propagation de la maladie se fait par voies aériennes. Seules les personnes qui manifestent la tuberculose pulmonaire peuvent transmettre l’infection. En dehors des poumons la tuberculose peut toucher d’autres parties du corps comme les ganglions, les muscles, les reins, la colonne vertébrale et le cerveau (4).

Cependant, tous les sujets infectés (latents) ne font pas la tuberculose (active). Le système immunitaire arrive à maîtriser ou à limiter l’infection qui se traduit par la tuberculose latente. Les bacilles de Koch (BK) peuvent ainsi être hébergés dans l’organisme du sujet pendant des années. Les sujets infectés dont le système immunitaire est affaibli sont beaucoup plus susceptibles de développer la tuberculose maladie.

Selon l’Organisation Mondiale de la Santé :

- Un tiers de la population mondiale est actuellement infectée ;
- De 5 à 10% des sujets infectés (non infectés par le VIH) développent la maladie ou deviennent contagieux au cours de leur existence. Les personnes infectées à la fois par le VIH et le bacille tuberculeux sont beaucoup plus susceptibles de développer la maladie (5).

La tuberculose est une maladie évitable et dans la plupart des cas, elle peut être guérie.

Certains facteurs démographiques et socio-économiques (la pauvreté et l’accès aux traitements) rendent difficile la prévention et le traitement de la maladie.

#### **3.1.1. Epidémiologie**

##### **3.1.1.1. Répartition géographique de la tuberculose (3)**

Selon le rapport 2010 de la lutte contre la tuberculose, en 2009 au niveau mondial, l’OMS a estimé l’incidence de la tuberculose à 9,4 millions de cas, dont 3,3 millions de femmes et à 1,1 million chez des personnes vivant avec le VIH. La prévalence était estimée à 14 millions et la mortalité à 1,3 millions chez les VIH négatifs et 380 000 chez les VIH positifs. La plupart des cas ont été constatés dans les régions africaines, de l’Asie du Sud-Est et du

Pacifique occidental, avec respectivement des taux de 35 %, 30% et 20%. Les sujets VIH-positifs représentaient entre 11 et 13% de l'ensemble des nouveaux cas de TB.

La même année 2009, 5,8 millions de cas de tuberculose ont été notifiés, ce qui correspond à un taux de détection des cas (TDC), défini comme la proportion des cas incidents notifiés de 63%, en augmentation par rapport au taux de 61% estimé en 2008. Dans la cohorte de 2008, sur les 2,6 millions de patients avec une tuberculose pulmonaire à frottis positif, 86% ont pu être traités avec succès.

Un traitement préventif au Cotrimoxazole a été débuté chez 300 000 patients positifs au VIH, et des antirétroviraux ont été administrés à 140 000 d'entre eux (ce qui représente respectivement 75% et 37% des cas notifiés de tuberculose positifs au VIH). Presque 80 000 personnes vivant avec le VIH ont reçu un traitement préventif à l'Isoniazide afin d'éviter qu'elles ne développent une tuberculose active. Cela constitue une amélioration par rapport aux années précédentes, mais ne représente encore que moins de 1% des personnes dans le monde vivant avec le VIH.

Le taux d'incidence mondial est retombé à 137 cas pour 100 000 en 2009 après avoir atteint un record de 142 pour 100 000 en 2004. Le taux décroît, mais lentement.

Le taux global de succès thérapeutique a atteint son plus haut niveau à 87% en 2008.

Depuis 1995, les stratégies Halte à la tuberculose et l'utilisation de DOTS (Directly Observed Treatment Short) ont permis de soigner 41 millions de personnes et d'éviter 6 millions de décès. Grâce aux programmes DOTS, 5,8 millions de cas de tuberculose ont été notifiés en 2009.

En 2008, on estimait à 440 000 les cas émergents de tuberculose multirésistante (MR) dans le monde entier.

A l'échelle mondiale en 2009 seuls un peu plus de 30 000 cas de tuberculose MR (12%) ont été déclarés. Le diagnostic pour la tuberculose multirésistante devra être développé rapidement, et tous les cas devront recevoir un traitement adapté.

En 2010, les données collectées par l'OMS font état des plus hauts taux de tuberculose MR jamais enregistrés, avec des records de 28% des nouveaux cas dans certaines parties de l'ex-Union soviétique.

### 3.1.1.2. Agent pathogène

La tuberculose est provoquée par des bacilles appartenant au complexe *tuberculosis*. Dans la majorité des cas, la tuberculose est causée par une mycobactérie appelée *Mycobacterium tuberculosis* ou encore bacille de Koch (BK), découvert en 1882 par Robert Koch.

Certaines mycobactéries sont responsables d'autres formes de maladies. Ainsi on distingue entre autre :

- *Mycobacterium africanum*,
- *Mycobacterium bovis*,
- *Mycobacterium leprae*
- ...

*Mycobacterium tuberculosis* est une mycobactérie stricte de l'homme, mais il est capable d'infecter certaines espèces animales proches de l'homme (6). En dehors des produits contaminés par l'homme infecté, on ne trouve pas le bacille de Koch dans la nature.

### 3.1.1.3. Mode de Transmission

La transmission du bacille de Koch est interhumaine. Elle s'effectue essentiellement par voie aérienne. La source de l'infection est un patient ayant une TB pulmonaire, qui expectore les bacilles. En toussant, en parlant ou en éternuant, le patient produit de fines gouttelettes infectieuses qui dessèchent et restent en suspension dans l'air pendant plusieurs heures. La contamination se produit lors de l'inhalation des gouttelettes infectieuses. (7)

Le risque d'infection dépend de plusieurs facteurs, tels que la contagiosité du sujet infecté, la proximité de contact, la charge bacillaire inhalée et le statut immunitaire de l'hôte (8, 9).

### 3.1.2. Physiopathologie :

Une fois inhalés, moins de 10% des bacilles de Koch atteignent les bronchioles respiratoires et les alvéoles, la plupart d'entre eux se limitent au niveau de l'épithélium des voies respiratoires supérieures et sont souvent éliminés (10). Les bactéries qui atteignent le lobe inférieur des poumons, sont phagocytées par les macrophages alvéolaires. Elles arrivent souvent à survivre dans les macrophages et initie une infection (11) . La paroi cellulaire du *M tuberculosis* est une membrane constituée de 2 couches lipidiques.

Les propriétés physico-chimiques de cette paroi lui permettent de survivre dans les phagocytes et de s'y multiplier (12).

La lésion primaire de la tuberculose est représentée histologiquement par un granulome à cellules épithélioïdes, centré par de la nécrose caséuse qui correspond à la lyse cellulaire. Généralement le processus de formation de granulomes est un moyen efficace pour contenir et empêcher la multiplication et la diffusion des pathogènes. Ainsi, les bacilles de Koch restent incapables de se multiplier au sein des cellules caséuses et peuvent entrer en dormance pendant des années.

Chez les immunocompétents, le système immunitaire peut entraîner l'arrêt définitif de l'infection à ce niveau. Par contre, chez les sujets immunodéprimés, en particulier ceux infectés par le VIH, la réponse immunitaire étant insuffisante, les bacilles peuvent s'échapper du granulome par les canaux lymphatiques intra-pulmonaires. Il en résulte une propagation rapide de l'infection pouvant causer la tuberculose maladie.

La primo infection est le portage de BK mais sans signe de maladie évolutive. La dormance des BK dans l'organisme se traduit par la tuberculose latente.

### **3.1.2.1. La tuberculose latente**

Après la contamination, le *M. tuberculosis* est phagocyté par les cellules présentatrices d'antigène au niveau des alvéoles pulmonaires. L'agent pathogène utilise plusieurs mécanismes de survie tels : la neutralisation du pH du phagosome, l'inhibition de la fonction présentatrice d'antigène du macrophage et des cellules dendritiques compromettant ainsi la stimulation des cellules T CD4 + et l'apoptose des macrophages infectés par interférence avec autophagie (13, 14, 15, 16). La formation d'un granulome permet d'éviter la maladie active dans un premier temps, mais l'agent pathogène n'étant pas éliminé, une infection latente est établie. Pendant la tuberculose latente, les bacilles tuberculeux sont résistants à l'attaque du système immunitaire car ils entrent dans un état de dormance sans activité répliquative. Cependant, un ensemble de gènes liés à la dormance appelés DosR régulon continue d'être exprimé lors de infection latente (17). Avec la formation de granulomes et une réponse immunitaire efficace, la plupart des bacilles tuberculeux sont tués et la progression de la maladie est stoppée (14, 18).

Dans d'autres cas les bacilles peuvent rester en dormance pendant toute la vie de l'hôte sans jamais causer de maladie active ou ils peuvent causer la maladie après plusieurs années, voire des décennies plus tard (19).

Le système immunitaire, à travers les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules T CD4+ et CD8+, les cellules gamma delta et les cytokines produites par ces cellules, induit une réponse immunitaire efficace contre le *M. tuberculosis* (18, 20). Les cellules T et les cytokines interféron- $\gamma$  sont les plus importantes des composantes impliquées dans l'induction de la réponse immunitaire contre le BK.

La réponse immunitaire spécifique est induite par les cellules T qui migrent vers le foyer d'infection, guidé par les chimiokines produites par les cellules infectées. L'accumulation des macrophages, des cellules T et d'autres cellules hôtes (cellules dendritiques, les fibroblastes, cellules endothéliales et cellules stromales) au niveau du foyer d'infection, conduit à la formation de granulomes sur le site de l'infection (14, 21). Les macrophages infectés présentent les antigènes de *M. tuberculosis* aux cellules T CD4 + qui après activation produisent l'IFN- $\gamma$  pour contrôler l'infection (18, 22).

Bien que la réactivation de l'infection latente pouvant se produire même des décennies après l'infection initiale, une personne peut développer la tuberculose active pendant les deux premières années après l'infection par *M. tuberculosis* (19).

Plusieurs facteurs peuvent déclencher le développement de la maladie active. Généralement, ce sont des facteurs qui impliquent l'affaiblissement du système immunitaire (15).

L'infection à VIH est le facteur de risque le plus important pour la progression vers une maladie active chez les adultes (23) car il provoque une déplétion des T CD4+ et entraîne des anomalies fonctionnelles des lymphocytes T CD4 + et / ou T CD8 + qui sont des cellules centrales pour la protection contre la tuberculose-maladie (24). De même, la tuberculose active entraîne l'aggravation du syndrome d'immunodéficience acquis (SIDA) et éventuellement conduit à la mort. La réactivation de la tuberculose peut survenir dans n'importe quel organe. Cependant, chez les personnes immunocompétentes, elle survient habituellement dans les lobes supérieurs, où il y a plus d'oxygène, condition favorable à la croissance bacillaire.

L'apparition de l'immunité spécifique à médiation cellulaire contre l'infection à *M. tuberculosis* pendant la tuberculose latente pourrait induire le virage de la réaction cutanée à la tuberculine (lors des tests intradermo réaction).



### 3.1.2.2. Réponse immunitaire à l'infection par le *M. tuberculosis* (25).

Les gouttelettes infectées par la mycobactérie (*M. tuberculosis*) sont inhalées et les bacilles atteignent à prédominance les lobes supérieurs des poumons. Ils sont alors phagocytés par les macrophages et les neutrophiles. Les neutrophiles s'accumulent tôt sur le site de l'infection, mais ils sont incapables d'éliminer directement le BK.

Les neutrophiles et les macrophages peuvent ensuite migrer vers les ganglions lymphatiques où ils présentent les antigènes de *M. tuberculosis*.

Dans les ganglions lymphatiques, cellules T CD4 activées se différencient en LT auxiliaires (Th1) sécrétant l'interféron (IFN- $\gamma$ ) ; les T CD8 se différencient en LT cytotoxiques et accumulent des molécules comme les granzymes et les granulysines (26). Dans le même temps, les LB sont activés et produisent les anticorps spécifiques contre le *M. tuberculosis* bien que l'implication de ces anticorps dans la protection contre l'infection extracellulaire par le *M. tuberculosis* reste très controversée. Plus récemment, des études ont montré que d'autres cellules T (Th17) sécrétant les interleukines (IL-17, IL-21 et IL-22) et des cellules T régulatrices, sécrétant l'IL-10 sont impliquées dans la coordination de la réponse immunitaire cellulaire (27, 28).

Ces cellules activées passent dans la circulation sanguine et atteignent les sites d'inflammation.

A ce stade, une hypersensibilité retardée peut être observée lors d'un test cutané à la tuberculine.

La sécrétion de cytokines par les L T auxiliaires (Th1) attire les cellules mononucléaires sur le site d'inflammation pour former un granulome, dans lequel les macrophages infectés par les mycobactéries se différencient en cellules épithélioïdes et sont entourées par les lymphocytes (29). Cette juxtaposition permet l'activation des macrophages, principalement par l'IFN- $\gamma$ .

L'activation des macrophages dans les granulomes entraîne une persistance du *M. tuberculosis* qui n'arrive plus à se répliquer. Cela se traduit par la tuberculose latente sans manifestations cliniques de la maladie.

L'immunité cellulaire peut s'estomper ou s'altérer pour diverses raisons, en particulier dans l'immunodéficience acquise ou induite par le médicament. Cela peut conduire à une réactivation de la réplication des mycobactéries conduisant à l'évolution de l'infection à tuberculose active.

### 3.1.2.3. Diagnostic de la tuberculose latente.

Le test cutané à la tuberculine ou intradermo réaction à la tuberculine IDR est la méthode la plus utilisée pour diagnostiquer l'infection par *M. tuberculosis* chez les tuberculeux latents (30). Un bon diagnostic nécessite une connaissance de l'antigène utilisé (tuberculine), de la base immunologique de la réaction à cet antigène, de la technique d'administration et de l'interprétation du résultat du test.

#### ➤ **La tuberculine**

La tuberculine est une lipoprotéine extraite du *Mycobacterium tuberculosis*. Le PPD, un dérivé tuberculinique de protéine purifiée est utilisé pour le test à la tuberculine. Le test à la tuberculine est basé sur le fait qu'il provoque une réaction d'hypersensibilité de type retardé chez les sujets infectés par *M. la tuberculosis*. Seules les personnes qui ont été exposées aux mycobactéries sont sensibles au test (31).

#### ➤ **Technique de l'IDR**

La réaction cutanée à la tuberculine est explorée par l'IDR. Cette IDR est réalisée par l'injection dans le derme à la face antérieure de l'avant-bras d'un volume de 0,1 ml de la solution liquide de tuberculine (Méthode de Mantoux). La validité d'interprétation du test tuberculinique nécessite une technique parfaite.

L'injection doit être strictement intradermique et exsangue. La réalisation de l'injection intradermique fait apparaître immédiatement une papule par soulèvement du derme prenant un aspect de peau d'orange, témoin d'une bonne réalisation technique (30).

La tuberculine provoque localement la libération de plusieurs lymphokines qui, dans les 24 à 72 heures suivantes, donnent une infiltration localisée de la peau, provoquée par l'œdème et l'accumulation de lymphocytes sensibilisés.

La lecture s'effectue idéalement à la 72<sup>ème</sup> heure. Elle peut être différée jusqu'au 5<sup>ème</sup> jour chez les sujets âgés pour lesquels la réactivation peut se développer plus lentement (32).

L'induration qui s'est développée autour du point de ponction est mesurée transversalement par rapport au sens de l'injection. Les limites de l'induration sont déterminées par la palpation et mesurées en millimètre à l'aide d'une règle graduée.

#### ➤ **Seuil de positivité en absence du VIH**

Une réaction est jugée négative lorsque le diamètre d'induration est < à 5 mm.

Une réaction est jugée positive lorsque le diamètre d'induration est ≥ à 5 mm.

➤ **Interprétation**

Une IDR à la tuberculine positive est habituellement le témoin d'une tuberculose-infection latente ou d'une tuberculose-maladie, mais d'autres mycobactéries (BCG, mycobactéries atypiques) peuvent entraîner une réaction positive par réaction croisée (33). Le diamètre de l'induration provoquée par des mycobactéries atypiques est généralement inférieur à celui observé avec le BK. (34)

L'IDR à la tuberculine négative s'observe chez les individus qui n'ont jamais été en contact avec le bacille tuberculeux. Cependant, au cours d'authentiques infections tuberculeuses, l'IDR peut rester négative.

L'interprétation de l'IDR à la tuberculine repose sur la taille de l'induration. Elle nécessite un interrogatoire précis, permettant de connaître les antécédents de vaccination par le BCG, l'hypersensibilité retardée antérieure du patient, une éventuelle immunodépression, notion d'un contact avec une personne tuberculeuse bacillifère.

Ainsi :

- **En absence de vaccination par le BCG**

Une IDR à la tuberculine dont le diamètre est  $\geq 10$  mm est en faveur d'une infection tuberculeuse suite à un contact direct avec *M. tuberculosis*.

- **Chez les vaccinés par le BCG**

La vaccination par le BCG induit le virage de l'IDR dans un délai de 3 mois. Le diamètre d'induration provoqué par la vaccination BCG est  $\geq 5$  mm.

Il existe des réactions fortement positives avec un diamètre d'induration  $\geq 10$  mm qui s'observe surtout dans les premières années qui suivent la vaccination (35). Ce diamètre diminue progressivement au fil des ans.

- **Chez les patients infectés par le VIH**

L'altération de l'immunité à médiation cellulaire diminue les réactions d'hypersensibilité retardée. Chez ces patients, il est nécessaire d'envisager la possibilité d'une tuberculose-infection latente dès 5 mm.

Pour les patients dont l'immunodépression est sévère en particulier avec un taux de lymphocytes CD4  $< 200/\text{mm}^3$ , une anergie fréquente à la tuberculine est rapportée au déficit immunitaire. Dans ce cas, la réaction cutanée tuberculique perd toute sa valeur discriminante (36).

#### **- Cas particuliers de l'infection tuberculeuse récente**

Le diagnostic fait lors d'une investigation menée autour d'un cas de tuberculose. Elle se traduit par un virage de l'IDR avec ou sans antécédent de vaccination par le BCG. Le virage se traduit par :

- soit une première IDR négative ( $< 5$  mm) suivie d'une 2<sup>ème</sup> IDR, réalisée 3 mois plus tard, positive ( $\geq 10$  mm)
- soit par une 1<sup>ère</sup> IDR faiblement positive (entre 5 à 9 mm)
- suivie d'une 2<sup>ème</sup> IDR fortement positive avec une augmentation du diamètre ( $>$  à 10 mm) entre 2 tests.

#### **3.1.2.4. L'hypersensibilité de type IV, ou hypersensibilité retardée**

Elle apparaît quand les macrophages ne parviennent pas à éliminer les antigènes qu'ils ont ingérés. Les lymphocytes T sont alors activés et produisent des lymphokines qui entraînent toute une variété de réponses inflammatoires (37). Les rares cellules qui réagissent efficacement à la tuberculine prolifèrent et forment un clone de cellules réactives après une exposition initiale. Un sujet qui a été exposé au bacille de la tuberculose ou vacciné avec le BCG possède des lymphocytes T sensibilisés à la tuberculine. Quand on lui injecte de la tuberculine par voie intradermique, il se produit une réaction inflammatoire au site d'injection en 24 à 48 heures. Généralement, la réaction à la tuberculine commence 5 à 6 h après l'injection et provoque une induration maximale de 48 à 72 h. Elle disparaît sur une période de quelques jours. Chez certains individus (les personnes âgées et ceux qui sont testés pour la première fois), la réaction peut atteindre son pic au-delà de 72 h (32).

#### **3.1.2.5. Le traitement de la tuberculose latente.**

Généralement, les antituberculeux utilisés sont des médicaments qui bloquent l'activité métabolique des bacilles de Koch. L'isoniazide est un médicament efficace contre la réplication de *M. tuberculosis* et le traitement à l'isoniazide de l'infection latente est efficace dans 60-90% des cas (38)

Le traitement à l'isoniazide (INH) est considéré comme traitement standard contre la tuberculose latente aux Etats-Unis et au Canada. Le traitement se fait sur période de neuf mois en fonction des résultats des tests cliniques, mais la durée du traitement peut être réduite à 6 mois pour les adultes séronégatifs à l'infection par le VIH (39).

L'inclusion de DOT (Traitement Directement observé) augmente substantiellement le cout de la prise en charge du traitement. L'efficacité du traitement à l'INH dans la prévention tuberculose active dépasse 90% chez les personnes bénéficiant du traitement associé au DOT.

Le traitement à la rifampicine (RMP) associé au pyrazinamide (PZA) pendant 4 mois est préconisé comme traitement alternative de choix dans la tuberculose latente (40).

Le programme national de lutte contre la tuberculose au Mali (PNLT) n'a pas inclus le traitement de la tuberculose latente dans son programme à notre connaissance.

Le déficit immunitaire chez les sujets tuberculeux latents, entraîne une évolution vers la tuberculose active ou tuberculose maladie. L'infection par le VIH est un facteur déterminant dans la réactivation de la tuberculose.

## **3.2. Infection par le VIH**

### **3.2.1. Epidémiologie**

#### *Au Mali :*

Les résultats de la dernière étude de séroprévalence de l'infection à VIH réalisée en 2006 dans la population générale adulte au cours de l'Enquête Démographie et de Santé (EDS IV) ont montré une baisse du taux de prévalence du sida de 1,7% à 1,3% faisant du Mali un pays à faible prévalence.

Toutefois, l'examen attentif de cette étude révèle des caractéristiques variables selon:

- Le sexe: Globalement les femmes sont plus touchées que les hommes (respectivement 1,5% et 1%).
- Les régions: la région de Bamako reste la plus touchée (2.0%), suivie par Mopti et Ségou (1,6% et 1,5% respectivement). Par contre les régions de Sikasso, Kayes et Tombouctou sont faiblement touchées de l'ordre de 0,7%.
- Les tranches d'âge: le pic de séroprévalence se situe, aussi bien chez les femmes que chez les hommes, dans la tranche d'âge 30-34 ans (2,2%), ce qui témoigne d'une épidémie déjà bien installée.
- Le milieu: la séroprévalence semblait être plus élevée en milieu urbain qu'en milieu rural.

L'évolution de la séroprévalence chez ces groupes à risque selon l'enquête ISBS5 2006 (enquête comportementale) montre une situation toujours préoccupante avec 35,3 % chez les professionnelles du sexe, 2,5% chez les routiers et 5,9% chez les vendeuses ambulantes. Enfin, les enquêtes régulières menées au niveau des 19 sites de surveillance sentinelle répartis sur pratiquement l'ensemble du pays, ont révélé une prévalence de 2,2% chez les femmes enceintes de moins de 25 ans (2).

### 3.2.2. Le virus de l'immunodéficience humaine VIH

#### 3.2.2.1. Taxonomie (41).

Les VIH appartiennent à la famille des Retroviridae et classé dans le genre des *Lentivirus*. C'est un virus à ARN équipé d'une enzyme structurale appelée transcriptase inverse ou reverse transcriptase. Deux types de virus ont été identifiés à ce jour, le VIH-1, répandu sur l'ensemble des continents, et le VIH-2 présent surtout en Afrique de l'Ouest (42).

#### 3.2.2.2. Structure et organisation du génome

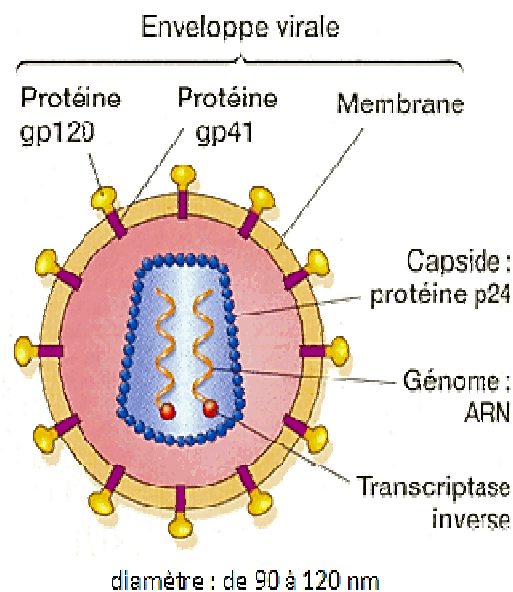


Figure 1: schéma de la structure du VIH.

Source : [www.axiomcafe.fr](http://www.axiomcafe.fr)

Consulté le 11/10/2011.

Le virus se présente sous forme de particule sphérique, constitué d'une enveloppe externe surmontée de spicules, qui entoure la nucléocapside constituée des protéines internes du virus, de l'enzyme nécessaire à la réplication-la transcriptase inverse- et de l'ARN viral. L'organisation du génome du VIH est complexe puisque que, en plus de trois gènes rétroviraux classiques (gag, pol, env), il existe des régions particulières qui contiennent au moins six gènes viraux supplémentaires (rev, vif, vpr, vpu, nef et tat). Ces gènes supplémentaires sont, pour la plupart, impliqués dans des phénomènes de régulation de l'expression des protéines virales et, par la-même, de la multiplication du virus (43). Ils semblent également modifier, l'expression de certains gènes cellulaires et donc provoquer une altération du fonctionnement des cellules de l'immunité touchées par le virus. Cette structure génétique complexe est spécifique de la sous-famille des *lentivirus*.

Le virus infecte les lymphocytes T CD4 et les CPA (cellules présentatrices d'antigène) telles que les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques, cellules clés du système immunitaire induisant un déficit profond de l'immunité cellulaire. De nombreuses études ont permis de mieux comprendre, notamment :

- Le tropisme spécifique du VIH pour les cellules immunocompétentes (44),
- Les relations entre réplication virale et déficit immunitaire (45, 46),
- Les réponses immunes spécifiques et innées, mises en jeu pour limiter la progression de cette infection (47, 48).

### **3.2.2.3. Tropisme du VIH pour les L CD4+**

Les LT CD4+ sont parmi les cellules cibles de l'infection VIH (49) du fait qu'elles expriment à leur surface le récepteur CD4 et l'un des corécepteurs (CCR-5 ou CXCR4). La molécule CD4 exprimée à la surface des LT CD4+, interagit spécifiquement avec la glycoprotéine de l'enveloppe du VIH la gp 120 induisant une cascade de mécanismes aboutissant à l'infection des cellules. Cette infection est responsable de l'initiation de la réponse T auxiliaire et de l'amplification des diverses fonctions du système immunitaire. La molécule CD4 fonctionne comme récepteur de haute affinité pour la gp 120. Les récepteurs accessoires sont nécessaires à la pénétration du VIH dans le LT CD4+, tels que les corécepteurs CCR-5 et CXCR-4 (50, 51). L'intégration du VIH dans la cellule hôte et sa réplication nécessitent une activation préalable de la cellule pour l'induction de réponse immunitaire.

#### 3.2.2.4. La réplication : (51, 52)

Le cycle de réplication du VIH a été divisé en plusieurs étapes :

- **Attachement** : la protéine gp120 du virus reconnaît et se fixe à la protéine CD4 puis au corécepteur à la surface du lymphocyte T.
- **Pénétration** : la membrane du virus et du lymphocyte fusionnent et la nucléocapside du virus est relarguée dans le cytoplasme.
- **Décapsulation** : la capside se dissocie libérant l'ARN viral dans le cytoplasme.
- **Intégration** : l'ARN viral est retranscrit en ADN double brin grâce à la reverse transcriptase virale. Cet ADN pénètre dans le noyau où il s'intègre au génome du lymphocyte. Il est ensuite transcrit en ARNm par l'ARN polymérase cellulaire.
- **Traduction** : les ARN messagers viraux sont traduits en 3 précurseurs protéiques. Ces précurseurs sont clivés par des protéases pour donner les différentes protéines du virus lors du processus de maturation après bourgeonnement.
- **Assemblage** : les protéines virales et l'ARN viral s'associent pour reconstituer des virions mais sans enveloppe. Les protéines virales s'intègrent à la membrane du lymphocyte.
- **Bourgeonnement** : le virion bourgeonne emportant un fragment de la membrane plasmique cellulaire.
- **Libération** : ces nouveaux virions sont déversés dans le milieu intérieur. Ils peuvent infecter d'autres lymphocytes T4 activés après leur maturation qui se caractérise par l'action de la protéase sur les précurseurs protéiques.

#### 3.2.3. Mode de transmission (53)

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

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

#### ✓ **La transmission sexuelle**

Dans le monde, la grande majorité des infections par le VIH ont été acquises à l'occasion des rapports sexuels non protégés.



La transmission se fait par l'intermédiaire des muqueuses génitale ou rectale, lorsque celles-ci sont en contact avec les sécrétions sexuelles ou du sang contenant du virus.

La muqueuse présente une certaine perméabilité vis-à-vis du VIH, et les cellules dendritiques infectées peuvent se retrouver dans la sous muqueuse après une exposition traumatique de l'épithélium vaginal au VIH. La muqueuse rectale, par son épithélium monocellulaire, est la plus susceptible à l'infection.

✓ **La transmission par voie sanguine**

Elle concerne principalement trois groupes de population : les usagers de drogues par voie intraveineuse, les hémophiles et les transfusés et plus rarement les professionnels de santé en milieu de soins et laboratoires, victimes d'accidents d'exposition au sang.

On peut aussi noter la transmission suite à l'utilisation d'aiguilles souillées (tatouages, acupuncture) ou suite à des morsures profondes avec saignement.

✓ **La transmission mère-enfant ou verticale**

La transmission du virus de la mère à l'enfant peut se faire à différentes étapes de la grossesse : dans les semaines précédant l'accouchement, ou moment de l'accouchement. La période de l'allaitement présente également un risque d'infection pour l'enfant.

### **3.2.4. Aspect clinique de l'infection par le VIH**

#### **3.2.4.1. La primo-infection (54)**

Dès la contamination, le virus se multiplie de façon intensive dans les cellules infectées. Environ 3 à 8 semaines après l'infection initiale, 50% à 70% des personnes présentent des symptômes qui ressemblent à ceux de la grippe ou de la mononucléose (55). Dans la plus part des cas cette primo-infection passe inaperçue. Cependant, elle peut s'accompagner de certains signes cliniques : fièvre, malaise général, maux de tête, courbatures et douleurs articulaires, éruption cutanée, ulcérations des muqueuses.

Ces symptômes disparaissent au bout d'une ou deux semaines. Le virus se réplique activement à cette phase et se propage dans tout l'organisme. Elle est appelée syndrome rétrovirale aigüe.

#### **3.2.4.2. La phase asymptomatique (53)**

C'est la phase la plus longue de l'infection qui peut durer en moyenne 10 ans. A cette phase le système immunitaire semble contrôler l'infection.

Cependant, le virus continue à se multiplier à une vitesse foudroyante dans les tissus lymphoïdes, tout en détruisant les cellules du système immunitaire dans la plupart des cas. Cette phase correspond à la phase de séropositivité sans ou peu de symptômes cliniques. Une baisse graduelle du nombre des CD4 présents dans le sang se produit souvent durant le stade asymptomatique de l'infection par le VIH. Ceci reflète probablement la capacité de plus en plus faible du système immunitaire à réagir à la réplication virale toujours croissante dans les ganglions lymphatiques et à la destruction constante des cellules du système immunitaire.

L'infection par le VIH pourrait entraîner la perte de la régulation des cytokines qui sont des messagers chimiques libérés par les cellules CD4 pour coordonner et contrôler les réponses immunitaires.

#### **3.2.4.3. La phase symptomatique/infections opportunistes (SIDA): (53)**

La déplétion lymphocytaire est compensée par la production de nouvelles cellules T CD4 jusqu'à ce que le processus de compensation s'effondre sous la poussée de la multiplication virale, apparaît alors le stade SIDA.

Cette évolution de l'infection se traduit par la survenue de pathologies plus ou moins graves. Certains symptômes d'allure banale peuvent apparaître (dermite séborrhéique, zona, herpès, candidoses oropharyngée). D'autres lésions sont plus spécifiques de l'infection par le VIH (leucoplasie chevelue de la langue). Le système immunitaire est maintenant en état d'insuffisance grave. Il se trouve alors dans l'incapacité de défendre correctement l'organisme contre la survenue de certaines infections. La chute rapide du taux de CD4 lors du SIDA pourrait aider à expliquer les différentes manifestations de dysfonctionnement du système immunitaire.

### 3.2.5. Traitement: (56)

#### 3.2.5.1. Objectif du traitement

Le traitement de l'infection à VIH a pour objectif la réduction maximale de la réplication virale, empêchant ainsi la progression vers le SIDA. Il permet de maintenir et de restaurer des fonctions immunitaires à travers la restauration du nombre des lymphocytes.

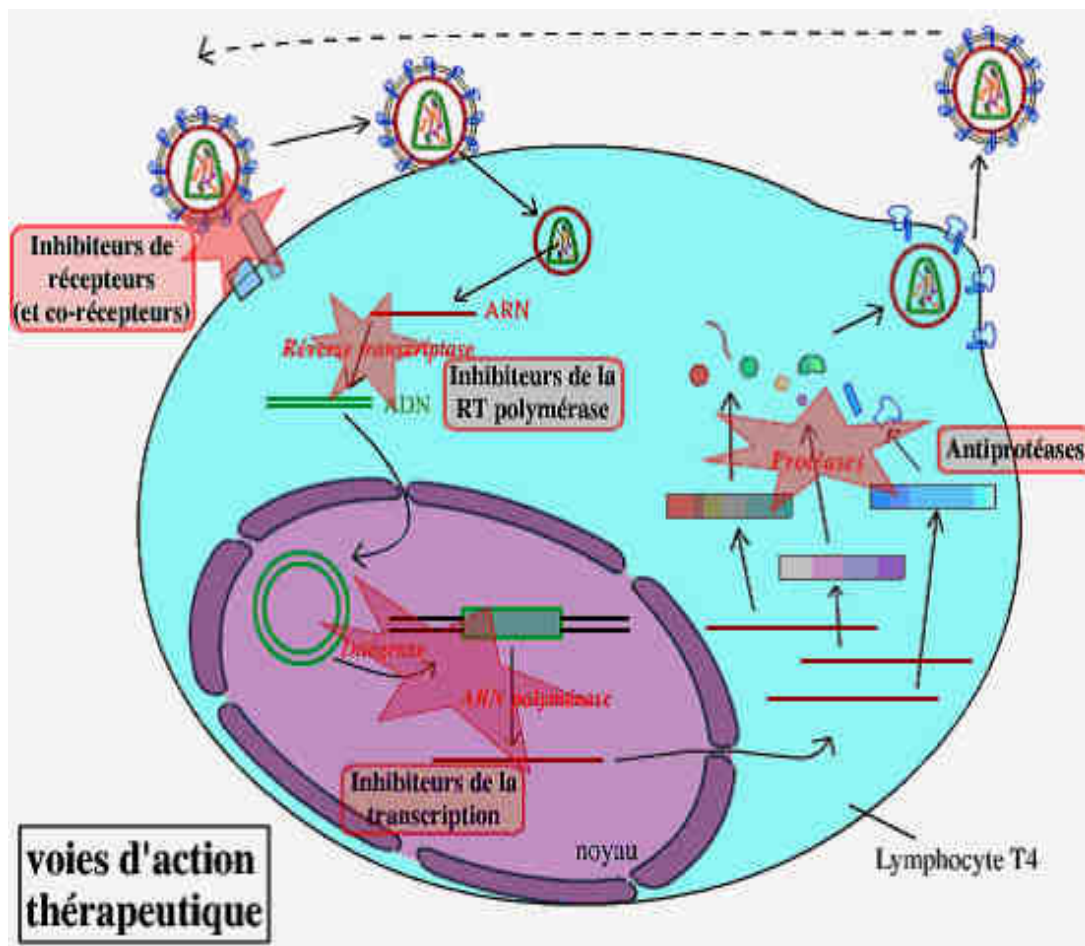


Figure 2 : Les voies d'action thérapeutiques des antirétroviraux (57).

Source : [www.snv.jussieu.fr](http://www.snv.jussieu.fr)

Consulté le 11 /10/2011

### **3.2.5.2. Les antirétroviraux.**

Les antirétroviraux sont classés en 6 classes médicamenteuses :

- *Les inhibiteurs nucléosidiques/nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI).*

On distingue le Ténovir, Emtricitabine (Truvada®), Abacavir et Lamivudine (Kivexa®), la Zidovudine.

- *Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI).*

Ils inhibent la transcriptase inverse du VIH-1 par liaison directe en perturbant le site catalytique de l'enzyme.

Nous avons : l'Efavirenz et Névirapine.

- *Les inhibiteurs de la protéase (IP)*

Ce sont des inhibiteurs spécifiques et réversibles des protéases. Ils entraînent la production de particules virales immatures et non infectieuses.

Nous avons entre autres : l'atazanavir/r, le darunavir/r, le lopinavir/r...

- *Les inhibiteurs de la fusion (IF)*

Le T-20 ou enfuvirtide (Fuzéon®), seule molécule de cette classe commercialisée, agit en amont des précédents en empêchant la transmission par le virus de son patrimoine génétique dans la cellule et donc l'infection de la cellule par le virus.

- *Les inhibiteurs du CCR5*

- *Les inhibiteurs de l'intégrase (INI)*

Raltégravir est un exemple de cette classe médicamenteuse.

### **3.2.6. Les réponses immunitaires contre l'infection par le VIH**

#### **3.2.6.1. Réplication et l'activation immune (45, 46).**

Lors des épisodes de stimulation antigénique des LT CD4, le VIH initie sa propre réplication dans la cellule. Il utilise toute la machinerie protéino-enzymatique de la cellule hôte pour la réplication. C'est ainsi que les molécules intracellulaires sont utilisées, telles que le NF Gama-B assurant la régulation de la transcription de cytokine. La plus part des cytokines produites par les LT CD4+ de type TH 1 semblent capables d'induire ou amplifier la réplication du VIH (IL-2, IL-1, IL-6, IL-10, TNF  $\alpha$ ). D'autres comme IFN- $\gamma$  et IFN-  $\alpha$  ou le TGF- $\beta$  semblent à l'inverse inhiber efficacement la réplication virale.

Cette réplication dans les LT CD4+ a pour conséquences :

- La persistance de l'infection VIH en dépit de la réponse immunitaire de l'organisme. Cela est probablement dû à l'établissement précoce de réservoirs viraux (CPA, LT CD4+ au repos) (58, 59).
- Le renouvellement rapide et permanent de nouveaux virions circulant traduit par la réplication dont résulterait l'accroissement régulier de la charge virale tissulaire et circulante, observé au cours de l'infection (60, 61).
- L'augmentation de la charge virale est considérée comme responsable de la disparition de LT CD4+ par des mécanismes directs (effet cytopathogène du VIH pour les LT CD4+) et indirects (perturbation de l'homéostasie et activation chronique des cellules immunocompétentes).
- La destruction progressive de LT CD4+ par le virus qui semble être responsable de l'altération des organes lymphoïdes centraux (Thymus) ne permettant plus leur régénération (62).
- Les phénomènes d'anergie, et d'apoptose ou encore de déséquilibre de sous population lymphocytaire sécrétrices de cytokine observés chez les patient (62) seraient amputable à l'importance de la charge virale et de l'état d'activation chronique et généralisés des cellules immunocompétentes. Cette activation chronique par la persistance de la réplication du virus serait impliquée dans l'évolution vers un déficit immunitaire profond.

### **3.2.6.2. Réponses immunes cellulaires au VIH**

Les réponses au VIH induites par les LT CD4+ auxiliaires était méconnue jusqu'à 1997 du fait du dysfonctionnement des cellules CD4+, elle est pourtant indispensable au déroulement efficace de la réponse immune. La capacité des LT CD4+ de produire de l'IL-2 et de l'IFN- $\gamma$  en réponse (Th 1) contre le VIH, est apparu déterminant dans deux situations :

- d'une part les sujets asymptomatiques à long terme (ALT), où cette réponse spécifique anti-VIH semble responsable de la non- progression ou de la progression extrêmement lente de l'infection.
- et d'autre part les primo-infections traitées précocement par antirétroviraux (63). Ils amplifient aussi de façon majeure les réponses des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) au VIH et jouent un rôle important en phase de primo-infection, où leur présence est déterminante pour que s'amplifient rapidement les CTL, de façon à contrôler efficacement la réplication virale. Le taux de l'IFN- $\gamma$  produit par les L Th 1 est inversement corrélé à la

réplication virale et constitue aujourd'hui l'un des meilleurs indicateurs d'une réponse immune efficace ; leurs cibles antigéniques principales semblent être les protéines de capsid p24 et p17 ainsi que la gp 120.

Le système immunitaire est affaibli progressivement par l'infection à VIH. L'évolution de la tuberculose latente vers la tuberculose maladie due au déficit immunitaire induit par le VIH est la principale cause qui conduit à la manifestation du SIDA et par suite à la mort.

### 3.3. La co-infection VIH/Tuberculose latente :

L'OMS dans son rapport 2010 de lutte contre la tuberculose rapporte que 5 à 10% des sujets mono-infectés par *M tuberculosis* développent la maladie ou deviennent contagieux au cours de leur existence.

Les personnes infectées à la fois par le VIH et le bacille tuberculeux sont beaucoup plus susceptibles de développer la tuberculose maladie. (5).

Parmi les 9,27 millions de cas d'incident de la tuberculose en 2007, une estimation 1,37 millions soit 14,8% étaient infectés par le VIH (64). La majorité de ces personnes co-infectées étaient dans les pays en voie de développement.

La tuberculose est la cause la plus fréquente de décès chez les patients atteints du VIH dans ces pays et représente jusqu'à un tiers des causes de décès liés au syndrome d'immunodéficience acquis (SIDA) dans le monde. Elle accélère la progression de l'évolution clinique de l'infection à VIH, conduisant à l'apparition d'autres infections opportunistes et la mort (65, 66). Le VIH augmente considérablement à la fois la probabilité de la réactivation de la tuberculose latente, et la progression de l'infection vers une tuberculose active après la primo-infection. Le risque de la survenue de la tuberculose soit par réactivation de l'infection latente ou soit à la suite d'une nouvelle infection chez les personnes infectées par le VIH est de 10 à 50 fois plus élevé que chez les sujets non infectés par le VIH (67, 68).

Bien que les mêmes principes de base de l'infection au *M. tuberculosis* sont observés chez les personnes infectées ou non par le VIH, les manifestations cliniques de la tuberculose varient dans l'infection par le VIH en fonction du degré de progression de l'immunosuppression chez les sujets infectés. La diminution du nombre de CD4 entraîne une dissémination du *M. tuberculosis* conduisant aux manifestations miliaires et extra-pulmonaires de la maladie. Ces caractéristiques spécifiques rendent le diagnostic difficile,

entraîne un retard dans l'initiation du traitement approprié, et augmente le taux de mortalité de 30% (69, 70).

L'infection à VIH associée ou non à la tuberculose latente entraîne des anomalies hématologiques et immunologiques (71).

### **3.4. Les paramètres hématologiques et immunologiques.**

Les paramètres hématologiques et immunologiques ont fait l'objet d'exploration dans les études portant sur l'infection à VIH et la tuberculose.

Ces recherches ont contribué à mieux comprendre le rôle régulateur joué par le système immuno-hématopoïétique, mettant en exergue les dérangements de ces circuits immunorégulateurs.

Nous les examinerons dans leur généralité, puis nous tenterons de les placer dans le contexte du VIH et de la tuberculose latente.

Les troubles hématologiques décrits touchent les deux principaux compartiments :

✓ Central :

Il est maintenant clairement établi que le VIH peut perturber la capacité de survie et de prolifération des progéniteurs hématopoïétiques.

L'effet suppresseur n'est pas réglémenté, que l'infection soit active ou latente, et est probablement médiée par l'interaction entre le virus ou ses protéines associées, et la membrane cellulaire des progéniteurs (71, 72) ; cette perturbation représente l'une des voies qui contribuent à la fréquence élevée de l'anémie, de la granulocytopenie et de la thrombocytopenie. Elle favorise également l'inaptitude pour la moelle à reconstituer un pool fonctionnel de lymphocytes T CD4+ matures (72).

✓ Périphérique :

Les mécanismes responsables de cytopénie périphérique observée sont essentiellement d'ordre immunologique, par la production d'anticorps dirigés contre les cellules sanguines, et de la séquestration splénique de ces cellules (73).

Des cas d'hémophagocytose ont été décrits chez les sujets infectés par le VIH dans la littérature (74).

#### **3.4.1. Les globules rouges**

Les globules rouges sont des cellules faisant partie des éléments figurés du sang. Ils prennent naissance dans la moelle osseuse. Les cellules souches hématopoïétiques pluripotentes par érythropoïèse donnent les globules rouges.

Ils assurent le transport de l'oxygène des poumons vers les cellules du corps et celui du gaz carbonique, liés à une molécule appelée hémoglobine.

Ils sont aussi chargés de régulation du pH sanguin.

La valeur normale des globules rouges dans une quantité de sang varie de 4,5 à 6 millions de cellules/ mm<sup>3</sup> chez l'homme et 4 à 5,5 millions cellules/ mm<sup>3</sup> chez les femmes.

La réduction du nombre des globules rouges entraîne une anémie (75).

De nombreuses études soutiennent que l'anémie est la plus fréquente manifestation clinique observée dans l'infection à VIH (76, 77, 78).

- **L'hémoglobine (Hb) :**

L'hémoglobine est un pigment de coloration rouge se trouvant dans les globules rouges et permettant le transport d'oxygène.

Le taux d'Hb exprimé en g/dl est un paramètre indicateur d'anémie.

- chez l'homme le taux est entre 14 et 18 g/dl

- chez la femme il est entre 12 et 16 g/dl.

La diminution des globules rouges s'accompagne par celle du taux d'Hb dans l'infection à VIH. Le taux bas d'Hb indiquant une anémie est rapporté dans la littérature (76, 78, 79, 80, 81).

- **L'hématocrite (Hte) :**

L'hématocrite représente la proportion de globules rouges en pourcentage du volume sanguin total. Un hématocrite normal est de 40-55% pour les hommes et 35-45% pour les femmes.

Sa valeur au cours de l'infection à VIH diminue ou augmente en fonction du nombre des globules rouges dans le sang.

- **Le volume globulaire moyen VGM :**

Le VGM représente la taille moyenne, ou le volume, des différents globules rouges.

Le rapport de l'hématocrite par le nombre de globules rouges donne le VGM.

$$\text{VGM} = \text{Hte} / \text{nombre de GR}$$

Sa valeur normale se situe entre 80 et 98 fl.

On parle de normocytose si le VGM est entre 80 et 98 fl ; macrocytose si le VGM > 98 fl et microcytose si le VGM < 80 fl.



**- La teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) et la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) :**

C'est la quantité et la concentration de l'hémoglobine dans un globule rouge en moyenne.

La TCMH a pour formule :

$$\text{TCMH} = \text{Hb} / \text{le nombre de GR}$$

La valeur normale de TCMH est entre 27,5 et 33,2 pg.

La CCMH se calcule quant à elle :

$$\text{CCMH} = \text{Hb} / \text{Hte}$$

La valeur normale de CCMH est entre 32 et 36 g/dl et on parle de normochromie. Quand la CCMH > 36 g/dl, c'est hyperchromie. Par contre si la CCMH < 32 g/dl, on parle de d'hypochromie.

La TCMH, le VGM, et la CCMH sont des paramètres qui déterminent le type de l'anémie.

### **3.4.2. Les plaquettes**

Elles prennent naissance dans la moelle hématopoïétique et sont produites par les mégacaryocytes médullaires. Les plaquettes sont de petites cellules sans noyau, ayant une forme de disque à l'état de repos. Elles circulent dans le sang pendant une durée de 8 à 10 jours. Elles ont un rôle primordial dans le processus de la coagulation sanguine. La numération plaquettaire normale est d'environ 130000-400000 cellules/mm<sup>3</sup>.

Au cours de l'infection par le VIH, une thrombocytopenie est généralement observée et serait due à deux mécanismes :

- La destruction massive des mégacaryocytes qui devaient se différencier en plaquettes (82).

➤ La séquestration splénique, aboutissant à la destruction des plaquettes par des complexes immuns circulants, et par la présence d'anticorps spécifiques dirigés contre gpIIb/IIIa plaquettaire (83) .

### 3.4.3. Les globules blancs

Les globules blancs ou leucocytes sont des cellules du système immunitaire destinées à assurer la défense de l'organisme.

Un adulte en bonne santé a normalement entre 4000 et 11000 globules blancs/ mm<sup>3</sup> de sang.

Une augmentation de globules blancs indique chez une personne une infection ou une vaccination récente. La diminution quant à elle peut être due à divers pathologies et à des cancers.

On distingue plusieurs types de leucocytes :

- **Les polynucléaires :**

**P. neutrophiles :** ce sont le premier type cellulaire à répondre à la plupart des infections, en particulier les infections bactériennes (le *M. tuberculosis* par exemple) et quelques processus inflammatoires. Ils ingèrent les microbes dans la circulation et pénètrent rapidement dans les tissus extravasculaires au niveau des sites d'infection, où ils peuvent également ingérer les microbes et meurent après quelques heures.

Ils constituent environ 50-70% des leucocytes.

Une infection entraîne une production accrue des neutrophiles stimulés par les cytokines produites par de nombreux types cellulaires en réponse à cette infection.

Une neutropénie (diminution du nombre de neutrophile) est surtout d'origine toxique médicamenteuse. Certains antirétroviraux comme la Zidovudine (AZT) peuvent entraîner une neutropénie (84, 85). Elle est sans signification clinique sauf en cas de maladie maligne associée qui nécessitera une chimiothérapie (86).

L'atteinte de la production associée ou non à l'augmentation de la destruction des leucocytes peuvent causer la neutropénie.

La neutropénie est aussi observée au cours de l'infection par le VIH (87).

**P. éosinophiles :** ils sont impliqués en premier lieu aux infections parasitaires et les réactions allergiques. Ils sont entre 0 et 6% des globules blancs.

**P. basophiles** : ils sont impliqués dans les réactions inflammatoires et dans certaines réactions allergiques. Ils sont plus rares et représentent seulement entre 0 et 1% des granulocytes.

- **Monocytes**

En plus de leur rôle phagocytaire, les monocytes participent à la présentation des éléments pathogènes aux lymphocytes. Ils circulent dans le sang pendant environ 24 heures et migrent vers les tissus et deviennent des macrophages.

Dans l'infection par *M. tuberculosis*, les macrophages phagocytent les bacilles. Par l'intermédiaire des facteurs chimiotactiques induits par la phagocytose du BK, les monocytes circulants, les lymphocytes, les neutrophiles sont attirés vers le site d'infection ; sans pouvoir éliminer efficacement le BK. Une augmentation de la production des monocytes et la libération des monocytes non matures sont cliniquement observées (88).

- **Les lymphocytes T (LT)**

Ils prennent naissance dans la moelle osseuse et arrivent en maturation dans le thymus et sont chargés de la coordination et de la régulation du système immunitaire. Il existe deux principales sous-populations de lymphocytes T qui se différencient à la fois par le phénotype et par la fonction.

Les LT CD4<sup>+</sup> : ils sont aussi appelés LT auxiliaires car ils aident les LB à produire les anticorps et les phagocytes à détruire les agents pathogènes ingérés. Ils peuvent aussi inhiber ou atténuer les réponses immunitaires (LT régulateur).

En revanche, les cellules T CD4<sup>+</sup> sont ciblées par le VIH pour la réplication, conduisant à la diminution progressive de leur nombre (91)

La diminution accrue du nombre des T CD4<sup>+</sup> entraîne un déficit de réponses immunitaires et conduit à l'apparition des maladies opportunistes et à la manifestation du sida. Chez les sujets tuberculeux latents, la déplétion des T CD4<sup>+</sup> entraîne une réactivation de *M. tuberculosis* de l'état de dormance. Cette réactivation a pour conséquence l'évolution de la tuberculose latente vers une tuberculose active (25).

- Les LT CD8<sup>+</sup> ou LT cytotoxiques :

Ils sont spécialisés dans la lyse des cellules hébergeant les microbes intracellulaires.

Durant l'infection par le VIH, les lymphocytes T qui représentent une composante

fondamentale du système immunitaire adaptative, ne sont pas épargnés.

Les LT CD8+ jouent un rôle important dans la lyse des cellules infectées par le virus. Chez les sujets infectés par le VIH, les cellules T CD8+ jouent un rôle protecteur contre l'évolution rapide de l'infection (89). Elles sont amplifiées à tous les stades de la maladie, en valeur absolue et en pourcentage, hormis en phase terminale de SIDA (90).

- **Les lymphocytes B (LB)**

Ils assurent la production des anticorps après leur activation. Les anticorps vont se lier aux antigènes pathogènes afin de permettre leur destruction par la formation d'immun-complexes.

L'infection par le VIH provoque plusieurs anomalies dans les sous-populations lymphocytaires B. Un défaut de production d'anticorps spécifiques d'antigène est observé (45).

**Les Natural Killer ou tueuses naturelles (NK, NKT) (92)**

Ce sont des cellules de l'immunité innée. Elles sont capables de reconnaître et de tuer les cellules cancéreuses ou infectées. Elles constituent environ 10% des lymphocytes du sang et des organes lymphoïdes périphériques. Leur activation déclenche la libération de la protéine contenue dans leurs granules cytoplasmiques vers les cellules infectées. Ces protéines entrent en contact avec les cellules infectées et occasionnent la pénétration des molécules qui activent les enzymes qui induisent la mort de la cellule par apoptose. D'autre part les NK activées sécrètent la cytokines IFN- $\gamma$  qui stimule les macrophages et augmente leur capacité de destruction des microbes phagocytés.

Le déficit d'activité des NK observé au cours de l'infection par le VIH pourrait refléter le déficit des LT CD4+ auxiliaires et en particulier le défaut de sécrétion d'IL-2 responsable de l'activation des NK.

Les NKT sont des cellules qui en possède à la fois des marqueurs de lymphocytes T et de Lymphocytes NK. Les NKT constituent 0,2 % environ des lymphocytes T du sang périphérique. Ce sont des cellules capables de produire de grandes quantités d'INF- $\gamma$ , d'IL-4, d'IL-2 de GM-CSF et TNF $\alpha$  après activation. Leurs dysfonctionnements ou déficiences conduisent au développement de maladies auto-immunes (comme le diabète).

## **4. La méthodologie :**

### **1. Type, période et lieu d'étude :**

Notre étude est descriptive et transversale, allant d'août 2010 à juillet 2011 et menée au Centre de Recherche et de Formation sur le VIH et la tuberculose (CEREFO/SEREFO) à la FMPOS.

### **.2. Population d'étude :**

Nous avons travaillé sur une population de 39 personnes et réparties en 4 groupes. Cette répartition est basée sur le statut sérologique associé ou non à la tuberculose latente.

Ainsi nous avons :

- groupe 1 : participants témoins : VIH- et IDR-,
- groupe 2 : participants tuberculeux latents séronégatifs : VIH- et IDR+,
- groupe 3 : participants co-infectés : VIH+ et IDR+,
- groupe 4 : participants séropositifs non tuberculeux latents : VIH+ et IDR-.

### **4.3. Critères d'éligibilité :**

#### **✓ Critères d'inclusion :**

- Avoir des veines facilement accessibles pour la prise de sang,
- Accepter de faire le test IDR et la sérologie du VIH.
- Donner son consentement écrit pour la participation à l'étude.

#### **✓ Critères de non inclusion :**

- Tous les sujets ayant une tuberculose active.
- Les cas d'auto-exclusion.

### **4.4. Echantillonnage :**

Notre échantillon d'étude est constitué de 39 patients choisis de façon aléatoire et répartis en 4 groupes comme suit :

- 10 participants témoins (VIH- et IDR-) dont 9/10 étaient confirmés vaccinés par BCG ;
- 13 participants tuberculeux latents séronégatifs (VIH- et IDR+) dont 10/13 étaient confirmés vaccinés par BCG ;
- 5 participants tuberculeux latents et co-infectés et par le VIH (VIH+ et IDR+) dont 3/5 étaient confirmés vaccinés par BCG ;
- 11 participants séropositifs, non tuberculeux latents (VIH+ et IDR-) dont 8/11 étaient confirmés vaccinés par BCG.

Nous avons une faible représentation du groupe des participants (5 au total) tuberculeux latents co-infectés par le VIH (VIH+ et IDR+). L'IDR est généralement négative chez les patients VIH+ qui ont un système immunitaire défaillant.

#### **4.5. Prélèvement d'échantillons sanguins :**

Le sang total a été prélevé sur 2 tubes:

- Un tube sec pour la sérologie rétrovirale.
- Un tube EDTA pour l'immunophénotypage et la numération formule sanguine.

#### **4.6. Diagnostic de l'infection tuberculeuse latente par le test tuberculinique :**

Le test utilisé a été l'intradermo-réaction (IDR) à la tuberculine.

Il consiste en l'injection intradermique d'un volume de 0,1ml de tuberculine PPD (dérivé protéinique purifié), soit 5 unités de tuberculine liquide.

La lecture se fait à 72H après l'injection, par inspection, palpation et mesure en mm du diamètre transversal de l'induration. L'IDR a été réalisée par les médecins cliniciens qualifiés faisant partie de l'équipe CEREF0/SEREF0.

#### **Interprétation**

L'IDR a été jugée positive :

- si le diamètre transversal de l'induration est supérieur à 5mm pour les sujets VIH positifs.
- pour les sujets VIH négatifs, si le diamètre transversal de l'induration est supérieur à 10 mm.

#### **4.7. Diagnostic sérologique de l'infection à VIH :**

##### **Méthodes d'analyses :**

##### **4.7.1. GENSCREEN® HIV1/2 Version 2**

Pour la mise en évidence des anticorps anti-VIH-1 et ou anti-VIH-2 la technique ELISA (GENSCEEN HIV1-2 Version 2) a été utilisée.

##### **4.7.1.1. Principe:**

Genscreen HIV1/2 version 2 est une technique immuno-enzymatique basée sur le principe du sandwich en deux étapes pour la détection des différents anticorps associés aux virus VIH1 et /ou VIH2, dans le sérum ou le plasma humain. Genscreen HIV1/2 repose sur l'utilisation d'une phase solide préparée avec les antigènes purifiés (protéines recombinants gp160 et p25 du virus VIH1 et peptide mimant l'épitope immunodominant de la glycoprotéine du virus VIH2) et d'un conjugué préparé avec des antigènes marqués à la peroxydase (protéine recombinante nucléocapsidique et peptides mimant les épitopes immunodominants des glycoprotéines d'enveloppe des VIH1 et VIH2).

#### **4.7.1.2 Trousse GENSCREEN/ HIV I/II V2 et le mode opératoire (voir annexe) :**

#### **4.7.2. NEW LAV BLOT I:**

##### **Principe du test**

Le test repose sur le principe de l'ELISA indirect sur bandelettes de nitrocellulose contenant toutes les protéines constitutives du virus VIH-1 et un contrôle interne anti-IgG. Les protéines du virus VIH-1 inactivée sont séparées en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu dissociant et réducteur, puis électrotransférés sur membrane de nitrocellulose.

#### **4.8. L'Immunophénotypage**

##### **4.8.1. Principe :**

Le sang total est ajouté aux anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes. Ces anticorps se fixent spécifiquement aux antigènes de surface des globules blancs.

Les échantillons marqués sont alors traités avec la solution de FACS lyse.

Cette solution lyse les érythrocytes et préserve les globules blancs et qui seront par suite analysés à l'aide d'un cytomètre de flux à 4 couleurs (FACScalibur®).

##### **4.8.2. Réalisation de l'immunophénotypage :**

###### **✓ Equipements**

- Hotte à flux laminaire
- Agitateur (vortex)
- Centrifugeuse de type Eppendorf®
- Portoirs
- FACScalibur®

✓ **Description du FACScalibur®**

Le FACScalibur® est un appareil modulaire muni d'un laser à argon de 488 nm d'amplitude et d'un laser à diode rouge de 635 nm. Il est composé de 3 systèmes :

- le système fluide qui assure l'introduction et le positionnement des cellules à analyser ;
- le système optique qui assure la production et recueil des signaux lumineux ;
- le système électronique qui se charge de la conversion des signaux électroniques et numérisation de ces signaux pour analyse informatique.

✓ **Principe de la Cytométrie de flux et duFACScalibur®**

La cytométrie de flux est une technique permettant de faire défiler des particules, molécules ou cellules à grande vitesse devant le faisceau d'un laser. La lumière réémise (par diffusion ou fluorescence) permet de classer la population suivant plusieurs critères.

Elle permet des mesures simultanées des différentes caractéristiques d'une cellule. Ainsi les cellules sont différenciées en fonction de leurs tailles, granularités, et de leurs intensités fluorescence dû au marquage par les anticorps.

Elle se définit donc comme l'étude précise de particules isolées (cellules, bactéries...) entraînées par un flux liquide. C'est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules en suspension dans un liquide. Elle consiste à analyser les signaux optiques ou physiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser ou d'une lampe à argon. Les signaux mesurés sont essentiellement relatifs:

- aux propriétés optiques intrinsèques des particules qui correspondent aux phénomènes de diffusion lumineuse liés aux dimensions de la particule, à leur structure interne ou à l'auto fluorescence de certaines cellules comme les cellules végétales, le phytoplancton, etc.
- aux propriétés optiques induites de fluorescence obtenues par des marquages spécifiques de structures ou de fonctions cellulaires.

Ces signaux séparés par un système constitué de filtres et miroirs sont collectés par des photomultiplicateurs (PMT). Ils sont amplifiés, numérisés, traités et stockés par un ordinateur grâce à un logiciel Cell Quest Pro. Ce procédé d'analyse individuelle (cellule par cellule) est multiparamétrique et peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde.



✓ **Les marqueurs des cellules :**

Deux cocktails d'anticorps ont été utilisés pour marquer les sous populations lymphocytaires.

Le Cocktail n°1 est constitué d'anticorps anti-CD3, anti-CD8, anti-CD45 et anti-CD4 couplés respectivement aux fluorochromes : FITC, PE, Percp Cy5.5 et APC. Les lymphocytes T CD8+ et T CD4+ vivants sont marqués.

Le Cocktail n°2 est constitué d'anticorps anti-CD3, anti-CD16-CD56, anti-CD45, anti-CD19 couplés respectivement aux fluorochromes : FITC, PE, Percp Cy5.5 et APC. Les LB et les NK et les NKT sont marqués.

✓ **Le mode opératoire (voir annexe).**

#### **4.9. L'hémogramme ou la numération formule sanguine :**

##### **4.9.1. Principe :**

La numération sanguine consiste à compter les différents éléments cellulaires du sang à savoir : globules blancs (ou leucocytes), globules rouges (ou hématies) et plaquettes sanguines. Elle permet aussi de mesurer les paramètres liés à ces éléments tels que le taux d'hémoglobine, volume globulaire moyen = VGM ou de calculer l'hématocrite, la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine = TCMH, la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine = CCMH. Elle est faite grâce à l'analyseur de AcT Diff (automate).

##### **4.9.2. Equipements**

✓ Deux Coulter Ac \* T Diff Analyseurs (P/N 6706366).

Coulter 1 S/N: AG32728; Coulter 2 S/N: AG37923.

✓ Une imprimante graphique : OKI Microline 3390,24 imprimante Pin,(P/N 899820220)

##### **4.9.3. Principe de fonctionnement de Coulter Ac \* T Diff Analyseurs**

La fonction de l'instrument est basée sur la méthode Coulter. La méthode Coulter permet de détecter et de mesurer les variations de résistance électrique quand une particule dans un liquide conducteur, passe à travers une petite ouverture. Comme chaque particule passe à travers l'ouverture, il empêche le courant et provoque une impulsion mesurable. Le nombre d'impulsions indique le nombre de particules. La hauteur de chaque de chaque impulsion est proportionnelle au volume de cette particule.

#### **4.9.4. Le mode opératoire (voir annexe).**

- **Numération manuelle**

Pour compléter la numération par l'automate qui ne différencie pas les granulocytes, un comptage manuel est effectué.

Pour le mode opératoire on prend le même échantillon de sang que l'automate pour effectuer un frottis sur une lame. La lame est colorée par le colorant Giemsa par un automate (Hematek 200). La lecture et le comptage sont effectués à l'aide d'un microscope optique à l'objectif 50 ou 100.

Les neutrophiles, les lymphocytes, les éosinophiles et les basophiles sont ainsi comptés.

#### **4.10. Saisie et analyse statistique des données**

##### **4.10.1. Analyse et présentation des résultats**

Les données stockées et traitées sur le logiciel Word et Excel 2007 ont été analysées et FlowJo Treestar version 9.3.2.

Ce qui permet d'avoir des résultats sous forme de figures avec les pourcentages et les valeurs absolues des cellules étudiées.

##### **4.10.2. Analyse statistique des données**

Les tests statistiques et le tracé des figures ont été réalisés sur le logiciel Graph Pad Prism 5. Le Mann-Whitney U test a servi pour la comparaison des médianes des pourcentages et des valeurs absolues des cellules entre les groupes de notre étude. Nous avons considéré comme significatives les valeurs de  $P < 0,05$ .

##### **4.10.3. Considérations éthiques :**

Cette étude a été acceptée par le comité d'éthique de deux inspections, à savoir :

- ✓ le comité d'éthique de la FMPOS (Mali);
- ✓ le comité d'éthique de NIH (National Institutes of Health, USA).

Les participants inclus dans l'étude ont signé un consentement éclairé écrit qui leur donnait le choix de se retirer de l'étude s'ils le souhaitaient

## 5. Les résultats:

### 5.1. Données socio-démographiques

**Tableau 1** : Répartition des patients selon le sexe et par groupe

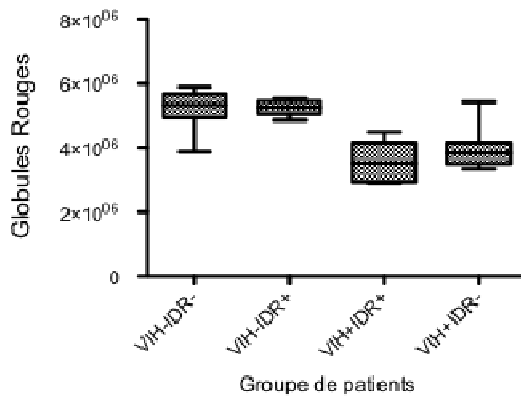
Sexe	Hommes	Femmes	Total	Pourcentage
<b>Groupes</b>				
VIH-IDR-	7	3	10	25,7
VIH-IDR+	12	1	13	33,3
VIH+IDR+	1	4	5	12,8
VIH+IDR-	1	10	11	28,2
<b>Total</b>	<b>21</b>	<b>18</b>	<b>39</b>	<b>100</b>

**Tableau 2** : Répartition par tranches d'âge

Tranche d'âge	VIH+IDR-	VIH+IDR-	VIH+IDR+	VIH+IDR-	Total & Pourcentage
<b>19-20 ans</b>	3	0	0	0	<b>3=&gt; 7,7%</b>
<b>21-30 ans</b>	6	11	2	4	<b>23=&gt;59%</b>
<b>31-40 ans</b>	0	2	2	6	<b>10=&gt;25,6%</b>
<b>41-50 ans</b>	0	0	1	0	<b>1=&gt;2,7%</b>
<b>51 et plus</b>	1	0	0	1	<b>2=&gt;5,%</b>
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>13</b>	<b>5</b>	<b>11</b>	<b>39=&gt;100%</b>

L'âge moyen des participants était de 29 ans, avec les extrêmes de 19 et 52 ans. Près de 59 % des participants avaient entre 21 et 30 ans. Nous avons la représentation des deux sexes avec une prédominance du sexe masculin (n=21), soit 53,8 % contre 46,2 % du sexe féminin (n=18). Le sexe-ratio H/F est donc de 1,16. Les antécédents vaccinaux sont retrouvés chez 30 des 39 participants.

## 5.2. Les Figures des paramètres comparés :



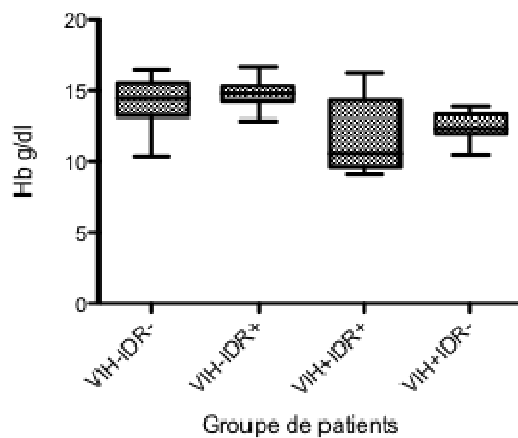
**Figure 4:** comparaison des médianes des valeurs absolues des globules rouges entre les différents groupes de l'étude.

**Tableau de la figure 4**

Groupe	Mediane	Comparaison	P
VIH-IDR-	$5,3 \times 10^6$	VIH-IDR-/ VIH-IDR+	0,7330
VIH-IDR+	$5,3 \times 10^6$	VIH-IDR-/ VIH+IDR-	<u>0,0043</u>
VIH+IDR+	$3,5 \times 10^6$	VIH-IDR+/ VIH+IDR+	<u>0,0016</u>
VIH+IDR-	$3,8 \times 10^6$	VIH+IDR+/ VIH+IDR-	0,3644

Il y avait pas de différence des médianes des GR chez les IDR+ comparées à ceux IDR-.

Les globules rouges étaient significativement plus bas chez les participants VIH+ que chez les VIH-. Cette diminution des GR était plus prononcée chez les participants VIH+IDR+.



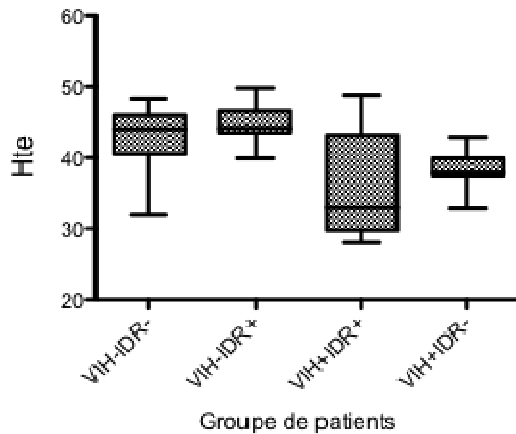
**Figure 5 :** comparaison des médianes du taux d'hémoglobine entre les différents groupes de l'étude.

**Tableau de la figure 5**

Groupe	Mediane	Comparaison	P
VIH-IDR-	14,5	VIH-IDR-/ VIH-IDR+	0,5146
VIH-IDR+	14,8	VIH+IDR+/ VIH+IDR-	0,2811
VIH+IDR+	10,6	VIH-IDR-/ VIH+IDR-	<u>0,0112</u>
VIH+IDR-	12,4	VIH-IDR+/ VIH+IDR+	<u>0,0432</u>

Il y avait pas de différence des médianes de l'Hb chez les IDR+ comparées à ceux IDR-

Une diminution significative du taux d'Hb était observée chez les participants VIH+. Elle était plus prononcée lorsque l'IDR est positif chez les VIH.

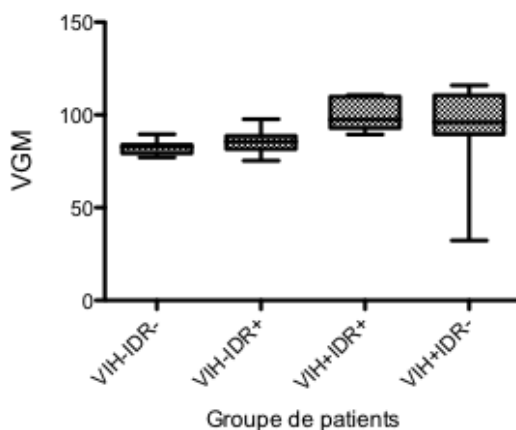


**Figure 6:** comparaison des médianes des pourcentages de l'hématocrite entre les différents groupes de l'étude.

**Tableau de la figure 6**

<u>Groupe</u>	<u>Mediane</u>	<u>Comparaison</u>	<u>P</u>
VIH-IDR-	44,1	VIH-IDR-/ VIH-IDR+	0,5766
VIH-IDR+	44,3	VIH+IDR+/ VIH+IDR-	0,2559
VIH+IDR+	30	VIH-IDR-/ VIH+IDR-	<u>0,0066</u>
VIH+IDR-	37,9	VIH-IDR+/ VIH+IDR+	<u>0,0487</u>

Il y avait pas de différence des médianes d'hématocrite chez les IDR+ comparées à ceux IDR-. Une diminution significative du pourcentage de l'hématocrite était observée chez les participants VIH+. Elle était plus prononcée lorsque leur IDR est positive.

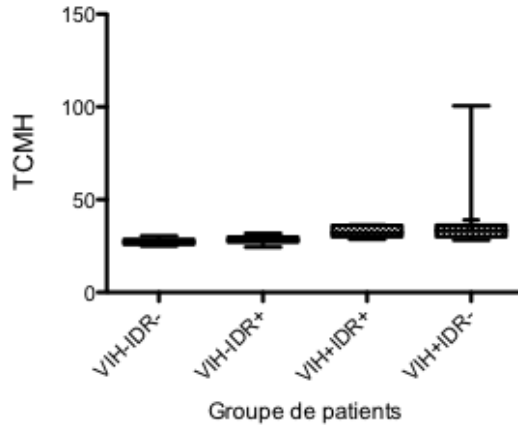


**Figure 7:** comparaison des médianes des valeurs du volume globulaire moyen VGM entre les différents groupes de l'étude.

**Tableau de la figure 7**

<u>Groupe</u>	<u>Mediane</u>	<u>Comparaison</u>	<u>P</u>
VIH-IDR-	82,7	VIH-IDR-/ VIH-IDR+	0,0672
VIH-IDR+	85,5	VIH+IDR+/ VIH+IDR-	0,7340
VIH+IDR+	97,4	VIH-IDR-/ VIH+IDR-	<u>0,0024</u>
VIH+IDR-	96	VIH-IDR+/ VIH+IDR+	<u>0,0058</u>

Il n'y avait pas de différence des médianes du VGM chez les IDR+ comparées à ceux IDR-. Une augmentation significative du VGM était constatée chez les VIH+ quel que soit le statut de l'IDR.

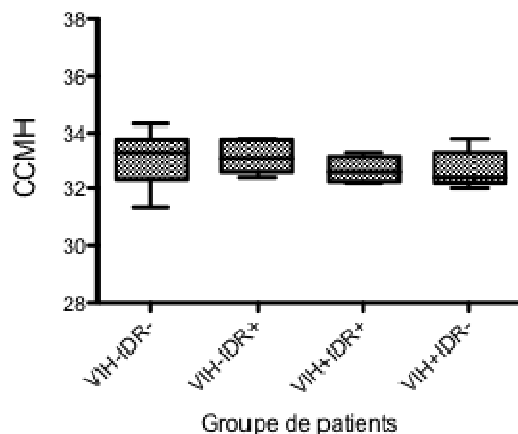


**Figure 8:** comparaison des médianes des valeurs de la teneur corpusculaire moyen en hemoglobine entre les différents groupes de l'étude

**Tableau de la figure 8**

Groupe	Mediane	Comparaison	P
VIH-IDR-	27	VIH-IDR-/ VIH-IDR+	0,1819
VIH-IDR+	28,2	VIH+IDR+/ VIH+IDR-	1,0000
VIH+IDR+	32,2	VIH-IDR-/ VIH+IDR-	<u>0,0005</u>
VIH+IDR-	33,3	VIH-IDR+/ VIH+IDR+	<u>0,0119</u>

Il n'y avait pas de différence des médianes de TCMH chez les IDR+ comparées à ceux IDR-. La TCHM était significativement plus élevée chez les participants VIH+ quel que soit le statut de l'IDR.

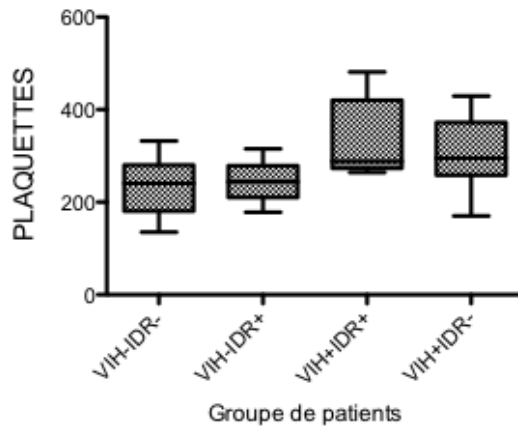


**Figure 9:** comparaison des médianes des valeurs de la concentration corpusculaire moyenne en hemoglobine entre les différents groupes de l'étude.

**Tableau de la figure 9**

Groupe	Mediane	Comparaison	P
VIH-IDR-	33,3	VIH-IDR-/ VIH-IDR+	0,9009
VIH-IDR+	33,1	VIH+IDR+/ VIH+IDR-	0,7754
VIH+IDR+	32,6	VIH-IDR-/ VIH+IDR-	0,1567
VIH+IDR-	32,4	VIH-IDR+/ VIH+IDR+	0,1254

Il n'y avait pas de différences significatives dans la comparaison de la CCMH entre les différents groupes de l'étude.



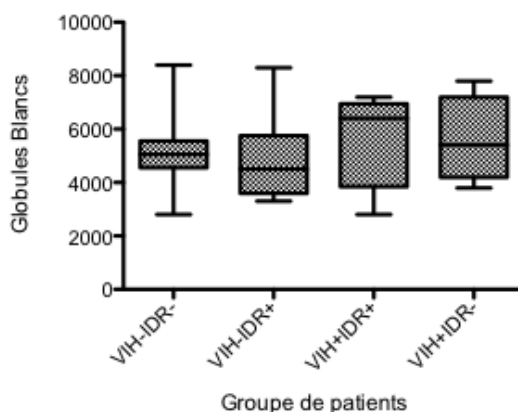
**Figure 10:** comparaison des médianes des valeurs absolues des plaquettes entre les différents groupes de l'étude.

**Tableau de la figure 10**

Groupe	Mediane	Comparaison	P
VIH-IDR-	$240 \times 10^3$	VIH-IDR-/ VIH-IDR+	0,7564
VIH-IDR+	$244 \times 10^3$	VIH+IDR+/ VIH+IDR-	0,5708
VIH+IDR+	$288 \times 10^3$	VIH-IDR-/ VIH+IDR-	0,0527
VIH+IDR-	$295 \times 10^3$	VIH-IDR+/ VIH+IDR+	<u>0,0301</u>

Il n'y avait pas de différence des médianes des plaquettes chez les IDR+ comparées à ceux IDR-.

Une augmentation significative des plaquettes étaient observée uniquement chez participants VIH+IDR+



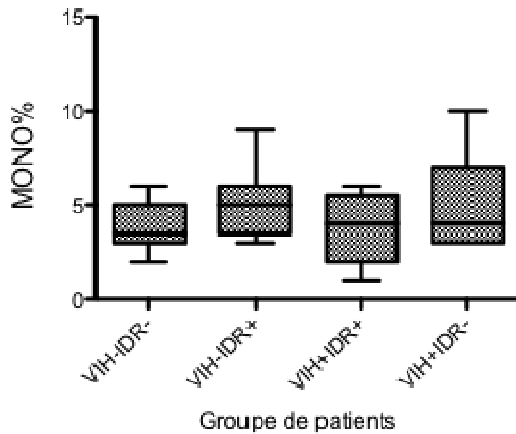
**Figure 11:** comparaison des médianes des valeurs absolues des globules blancs entre les différents groupes de l'étude.

**Tableau de la figure 11**

Groupe	Mediane	Comparaison	P
VIH-IDR-	5050	VIH-IDR-/ VIH-IDR+	0,5349
VIH-IDR+	4500	VIH-IDR+/ VIH+IDR+	0,3748

VIH+IDR+	6400	VIH+IDR+ / VIH+IDR-	0,9547
VIH+IDR-	5400	VIH-IDR-/ VIH+IDR-	0,5027

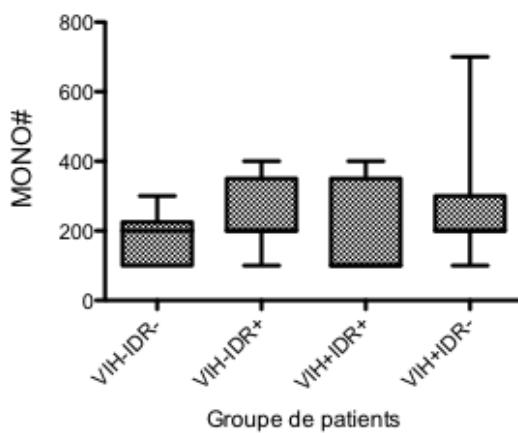
Il n'y avait pas de différences significatives entre les médianes des globules blancs entre les 4 groupes de comparaison. Cependant, un nombre plus élevé de GB avait été constaté chez les VIH+. Elle est plus prononcée lorsque leur IDR est positive.



**Figure 12:** comparaison des médianes des pourcentages des monocytes entre les différents groupes de l'étude.

**Tableau de la figure 12**

Groupe	Mediane	Comparaison	P
VIH-IDR-	3	VIH-IDR-/ VIH-IDR+	0,0684
VIH-IDR+	5	VIH+IDR+/ VIH+IDR-	0,6425
VIH+IDR+	4	VIH-IDR-/ VIH+IDR-	0,3612
VIH+IDR-	4	VIH-IDR+/ VIH+IDR+	0,2879



**Figure 13:** comparaison des médianes des valeurs absolues des monocytes entre les différents groupes de l'étude.

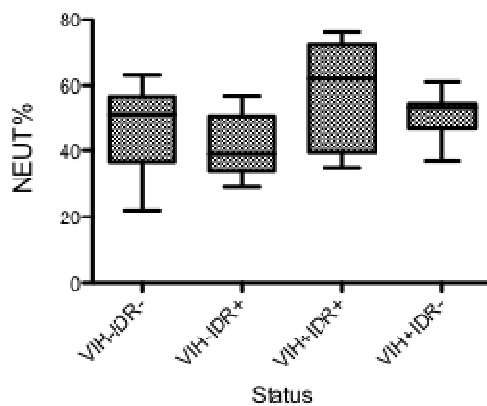
**Tableau de la figure 13**

Groupe	Mediane	Comparaison	P
VIH-IDR-	200	VIH-IDR-/ VIH-IDR+	0,2199
VIH-IDR+	200	VIH+IDR+/ VIH+IDR-	0,4776



VIH+IDR+	100	VIH-IDR-/ VIH+IDR-	0,4659
VIH+IDR-	200	VIH-IDR+/ VIH+IDR+	0,3846

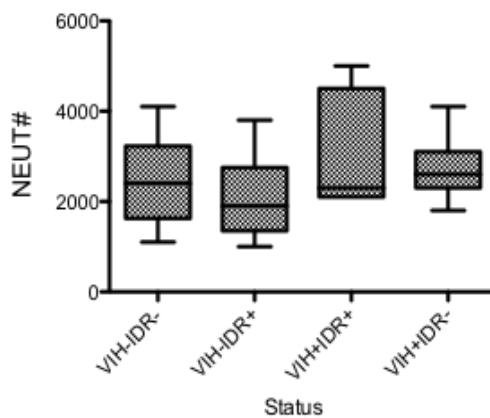
Il n'y avait pas de différences significative des monocytes en termes de pourcentage et de valeur absolue entre les différents groupes de l'étude.



**Figure 14:** comparaison des médianes des pourcentages des neutrophiles entre les différents groupes de l'étude.

**Tableau de la figure 14**

Groupe	Mediane	Comparaison	P
VIH-IDR-	51	VIH-IDR-/ VIH-IDR+	0,1816
VIH-IDR+	39	VIH+IDR+/ VIH+IDR-	0,4960
VIH+IDR+	62	VIH-IDR-/ VIH+IDR-	0,7506
VIH+IDR-	53	VIH-IDR+/ VIH+IDR+	0,1031



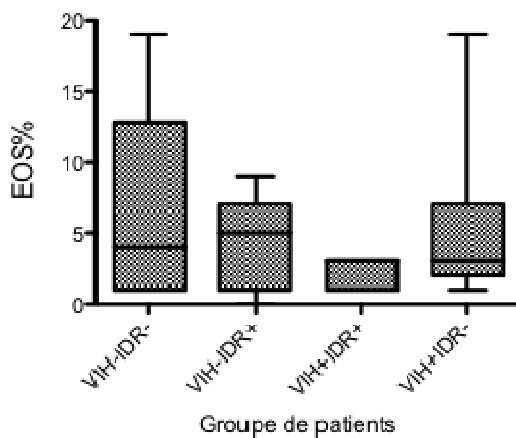
**Figure 15 :** comparaison des médianes des valeurs absolues des neutrophiles entre les différents groupes de l'étude.

**Tableau de la figure 15**

Groupe	Mediane	Comparaison	P
VIH-IDR-	2400	VIH-IDR-/ VIH-IDR+	0,4376

VIH-IDR+	1900	VIH+IDR+/ VIH+IDR-	0,8645
VIH+IDR+	2300	VIH-IDR-/ VIH+IDR-	0,4171
VIH+IDR-	2600	VIH-IDR+/ VIH+IDR+	0,0936

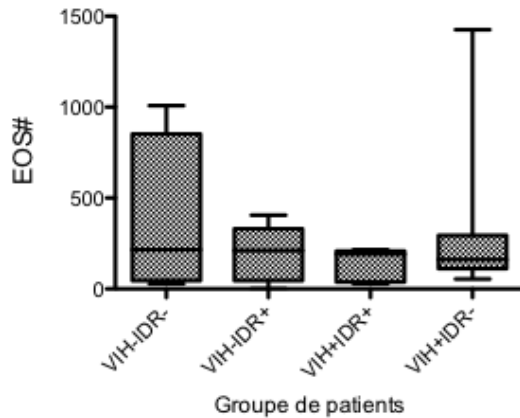
Il n'y avait pas de différence significative des pourcentages et des valeurs absolues des neutrophiles entre les différents groupes de l'étude.



**Figure 16:** comparaison des médianes des pourcentages des eosinophiles entre les différents groupes de l'étude.

**Tableau de la figure 16**

<u>Groupe</u>	<u>Mediane</u>	<u>Comparaison</u>	<u>P</u>
VIH-IDR-	4	VIH-IDR-/ VIH-IDR+	0,4276
VIH-IDR+	5	VIH+IDR+/ VIH+IDR-	0,2031
VIH+IDR+	3	VIH-IDR-/ VIH+IDR-	0,8033
VIH+IDR-	3	VIH-IDR+/ VIH+IDR+	0,2671

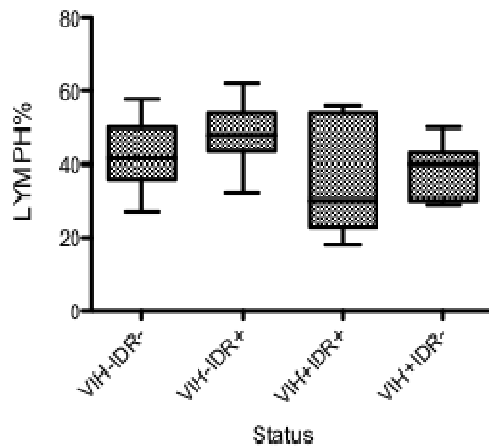


**Figure 17:** comparaison des médianes des valeurs absolues des eosinophiles entre les différents groupes de l'étude.

**Tableau de la figure 17**

Groupe	Mediane	Comparaison	P
VIH-IDR-	216	VIH-IDR-/ VIH-IDR+	0,5558
VIH-IDR+	210	VIH+IDR+/ VIH+IDR-	0,4967
VIH+IDR+	192	VIH-IDR-/ VIH+IDR-	0,6726
VIH+IDR-	162	VIH-IDR+/ VIH+IDR+	0,4019

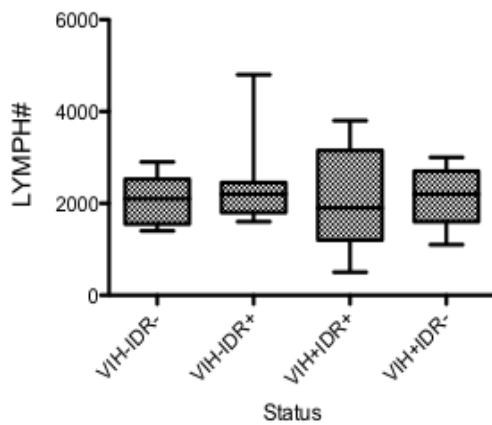
Il n'y avait pas de différence significative des pourcentages et des valeurs absolues des eosinophiles entre les différents groupes de l'étude.



**Figure 18:** comparaison des médianes des pourcentages des lymphocytes entre les différents groupes de l'étude.

**Tableau de la figure 18**

Groupe	Mediane	Comparaison	P
VIH-IDR-	42	VIH-IDR-/ VIH-IDR+	0,0715
VIH-IDR+	48	VIH+IDR+/ VIH+IDR-	0,7332
VIH+IDR+	30	VIH-IDR-/ VIH+IDR-	0,4374
VIH+IDR-	40	VIH-IDR+/ VIH+IDR+	0,2366

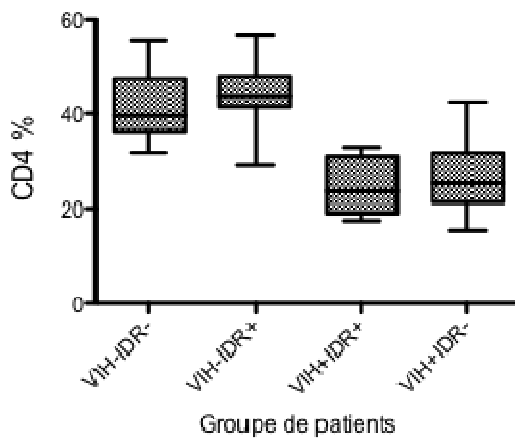


**Figure 19:** comparaison des médianes des valeurs absolues des lymphocytes entre les différents groupes de l'étude.

**Tableau de la figure 19**

Groupe	Mediane	Comparaison	P
VIH-IDR-	2100	VIH-IDR-/ VIH-IDR+	0,6407
VIH-IDR+	2200	VIH+IDR+/ VIH+IDR-	1,0000
VIH+IDR+	1900	VIH-IDR-/ VIH+IDR-	0,8600
VIH+IDR-	2200	VIH-IDR+/ VIH+IDR+	0,8820

Il n'y avait pas de différence significative des pourcentages et des valeurs absolues des lymphocytes entre les différents groupes de l'étude.

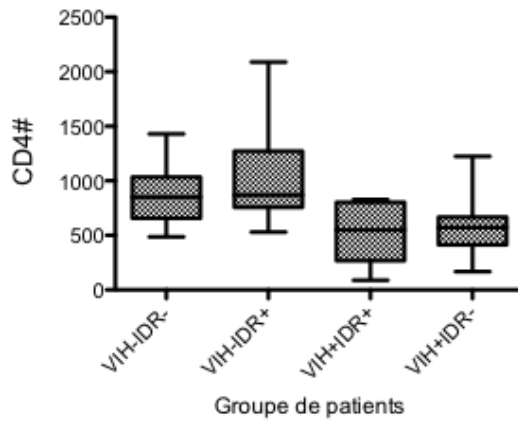


**Figure 20:** comparaison des médianes des pourcentages des CD4 entre les différents groupes de l'étude.

**Tableau de la figure 20**

Groupe	Mediane	Comparaison	P
VIH-IDR-	40	VIH-IDR-/ VIH-IDR+	0,4381

VIH-IDR+	44	VIH+IDR+/ VIH+IDR-	0,8208
VIH+IDR+	24	VIH-IDR-/ VIH+IDR-	<u>0,0028</u>
VIH+IDR-	25	VIH-IDR+/ VIH+IDR+	<u>0,0022</u>

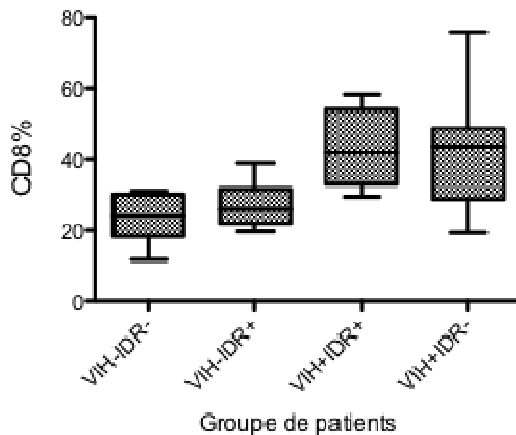


**Figure 21:** comparaison des médianes des valeurs absolues des CD4 entre les différents groupes de l'étude

**Tableau de la figure 21**

Groupe	Mediane	Comparaison	P
VIH-IDR-	852	VIH-IDR-/ VIH-IDR+	0,3685
VIH-IDR+	869	VIH+IDR+/ VIH+IDR-	1,0000
VIH+IDR+	549	VIH-IDR-/ VIH+IDR-	<u>0,0151</u>
VIH+IDR-	572	VIH-IDR+/ VIH+IDR+	<u>0,0205</u>

Il n'y avait pas de différence des médianes des CD4 chez les IDR+ comparées à ceux IDR-. Les pourcentages et les valeurs absolues des CD4 étaient significativement plus bas chez les participants VIH+ quel que soit le statut de leur IDR.

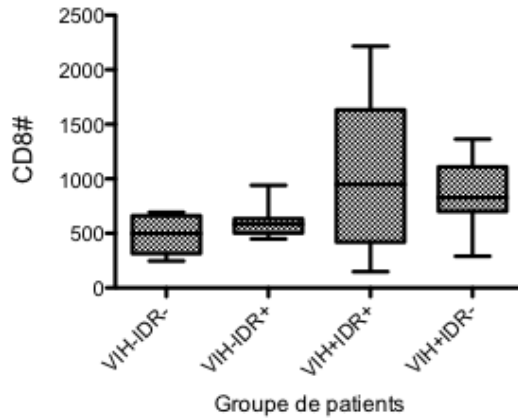


**Figure 22:** comparaison des médianes des pourcentages des CD8 entre les différents groupes de l'étude.

**Tableau de la figure 22**

Groupe	Mediane	Comparaison	P
VIH-IDR-	24	VIH-IDR-/ VIH-IDR+	0,2916

VIH-IDR+	26	VIH+IDR+/ VIH+IDR-	0,8208
VIH+IDR+	42	VIH-IDR-/ VIH+IDR-	<u>0,0054</u>
VIH+IDR-	44	VIH-IDR+/ VIH+IDR+	<u>0,0137</u>

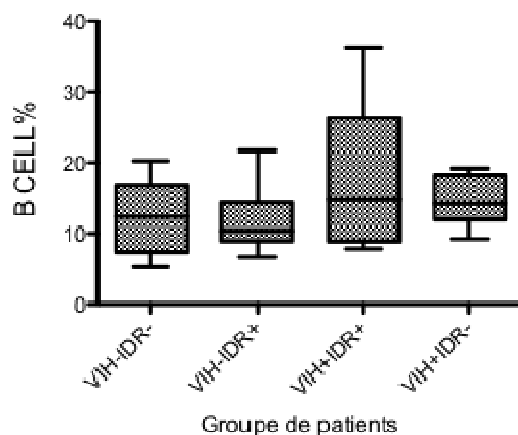


**Figure 23:** comparaison des médianes des valeurs absolues des CD8 entre les différents groupes de l'étude.

**Tableau de la figure 23**

Groupe	Mediane	Comparaison	P
VIH-IDR-	499	VIH-IDR-/ VIH-IDR+	0,2642
VIH-IDR+	585	VIH+IDR+/ VIH+IDR-	0,9098
VIH+IDR+	948	VIH-IDR-/ VIH+IDR-	<u>0,0028</u>
VIH+IDR-	828	VIH-IDR+/ VIH+IDR+	<u>0,0938</u>

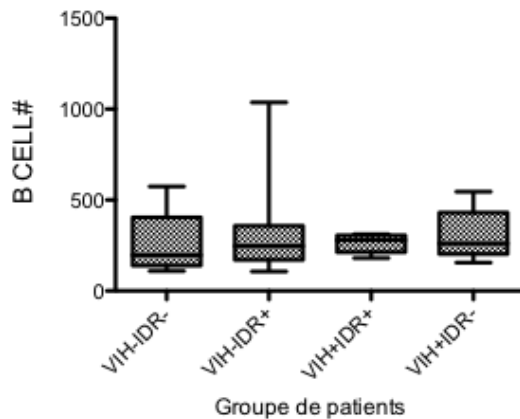
Il n'y avait pas de différence des médianes des CD8 chez les IDR+ comparées à ceux IDR-. Contrairement aux CD4, les pourcentages des CD8 étaient élevés chez les participants VIH+ quel que soit le statut de leur IDR. La valeur absolue des CD8 était significativement élevée uniquement chez les participants VIH+IDR+.



**Figure 24:** comparaison des médianes des pourcentages des cellules B entre les différents groupes de l'étude.

**Tableau de la figure 24**

<u>Groupe</u>	<u>Mediane</u>	<u>Comparaison</u>	<u>P</u>
VIH-IDR-	12	VIH-IDR-/ VIH-IDR+	0,8282
VIH-IDR+	10	VIH+IDR+/ VIH+IDR-	1,0000
VIH+IDR+	14	VIH-IDR-/ VIH+IDR-	0,3072
VIH+IDR-	14	VIH-IDR+/ VIH+IDR+	0,4304

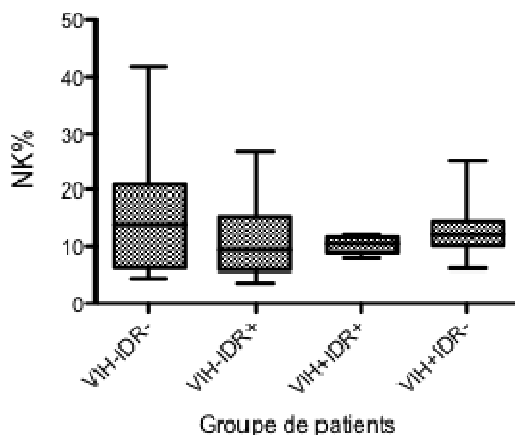


**Figure 25:** comparaison des médianes des valeurs absolues des cellules B entre les différents groupes de l'étude.

**Tableau de la figure 25**

<u>Groupe</u>	<u>Mediane</u>	<u>Comparaison</u>	<u>P</u>
VIH-IDR-	196	VIH-IDR-/ VIH-IDR+	0,7330
VIH-IDR+	247	VIH+IDR+/ VIH+IDR-	1,0000
VIH+IDR+	279	VIH-IDR-/ VIH+IDR-	0,2751
VIH+IDR-	260	VIH-IDR+/ VIH+IDR+	0,7674

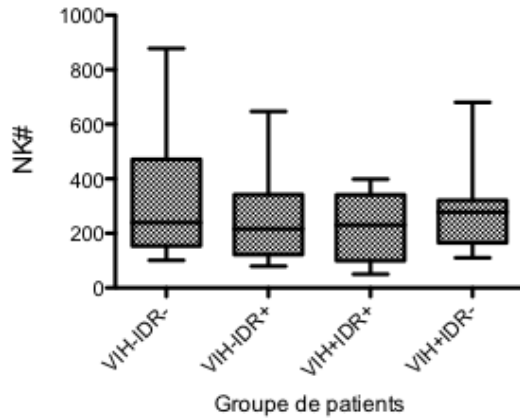
Il n'y avait pas de différence significative des pourcentages et des valeurs absolues des cellules B entre les différents groupes de l'étude.



**Figure 26 :** comparaison des médianes des pourcentages des NK entre les différents groupes de l'étude.

**Tableau de la figure 26**

<u>Groupe</u>	<u>Mediane</u>	<u>Comparaison</u>	<u>P</u>
VIH-IDR-	14	VIH-IDR-/ VIH-IDR+	0,3062
VIH-IDR+	9	VIH+IDR+/ VIH+IDR-	0,2566
VIH+IDR+	10	VIH-IDR-/ VIH+IDR-	0,8053
VIH+IDR-	12	VIH-IDR+/ VIH+IDR+	0,6221

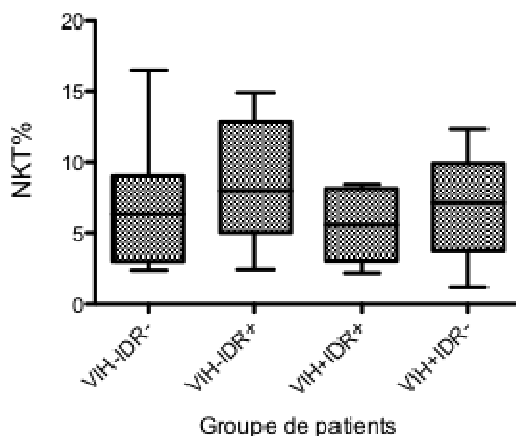


**Figure 27:** comparaison des médianes des valeurs absolues des NK entre les différents groupes de l'étude.

**Tableau de la figure 27**

<u>Groupe</u>	<u>Mediane</u>	<u>Comparaison</u>	<u>P</u>
VIH-IDR-	239	VIH-IDR-/ VIH-IDR+	0,4755
VIH-IDR+	215	VIH+IDR+/ VIH+IDR-	0,4967
VIH+IDR+	230	VIH-IDR-/ VIH+IDR-	0,9719
VIH+IDR-	278	VIH-IDR+/ VIH+IDR+	1,0000

Il n'y avait pas de différence significative des pourcentages et des valeurs absolues des NK entre les différents groupes de l'étude

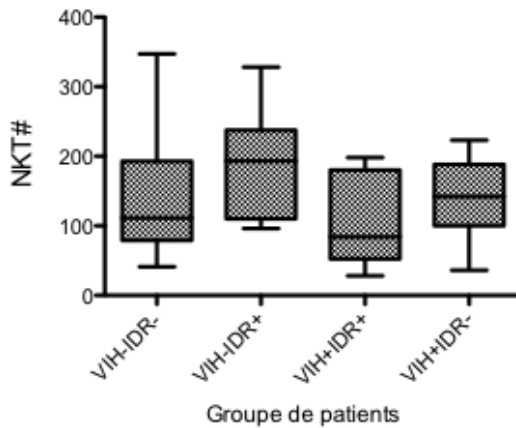


**Figure 28:** comparaison des médianes des pourcentages des NKT entre les différents groupes de l'étude.

**Tableau de la figure 28**



<u>Groupe</u>	<u>Mediane</u>	<u>Comparaison</u>	<u>P</u>
VIH-IDR-	6	VIH-IDR-/ VIH-IDR+	0,4025
VIH-IDR+	8	VIH+IDR+/ VIH+IDR-	0,4967
VIH+IDR+	5	VIH-IDR-/ VIH+IDR-	0,5495
VIH+IDR-	7	VIH-IDR+/ VIH+IDR+	0,2369



**Figure 29:** comparaison des médianes des valeurs absolues des NK entre les différents groupes de l'étude.

**Tableau de la figure 29**

<u>Groupe</u>	<u>Mediane</u>	<u>Comparaison</u>	<u>P</u>
VIH-IDR-	111	VIH-IDR-/ VIH-IDR+	0,1628
VIH-IDR+	193	VIH+IDR+/ VIH+IDR-	0,4278
VIH+IDR+	84	VIH-IDR-/ VIH+IDR-	0,6985
VIH+IDR-	188	VIH-IDR+/ VIH+IDR+	0,0610

Il n'y avait pas de différence significative des pourcentages et des valeurs absolues des NKT entre les différents groupes de l'étude.

## 6. Discussion

Notre travail est une étude descriptive des paramètres hématologiques et immunologiques dans la tuberculose latente associée ou non à l'infection par le VIH au Mali.

L'échantillonnage de cette étude a inclus 39 personnes venant de l'hôpital du Point G dans le service de pneumologie.

Les deux sexes étaient représentés. Le sex ratio de 1,16 avec une prédominance du sexe masculin (n=21) soit 53,8%. Le sexe féminin représentait 46,2% (n=18).

## **6.1. La méthodologie utilisée**

L'étude a été effectuée dans un laboratoire certifié conforme aux normes internationales de niveau de sécurité 2 et 3. Le respect strict des procédures standardisées (SOP), et l'assurance de qualité du laboratoire soumis aux contrôles externes réguliers de la qualité constituent la principale force de cette étude. C'est cette rigueur des investigations qui a permis de générer ces résultats.

Au cours de cette étude nous avons confirmé tous les cas d'infections par le VIH avec la technique Western Blot (NEW LAV BLOT I).

Le dénombrement des sous populations de lymphocytes a été réalisé par cytométrie de flux. Elle a permis de faire une analyse multiparamétrique des cellules basée sur la taille, la granularité et les intensités de fluorescence.

L'automate Ac\* T Diff™ a permis de quantifier les paramètres hématologiques. La numération formule sanguine a été complétée par comptage manuel après la coloration au Giemsa.

Le diagnostic de l'infection tuberculeuse latente a été effectué par l'Intradermo-réaction par des cliniciens du CEREFO/SEREFO.

## **6.2. Les résultats obtenus**

### **6.2.1. Les globules rouges, hémoglobine, hématocrite, VGM, TCMH, CCMH.**

Nous n'avons pas observé de différence dans la comparaison des paramètres hématologiques entre les groupes de participants IDR+ et les groupes de participants IDR-. Cependant une diminution significative des globules rouges a été observée chez les participants VIH+. La tuberculose latente (IDR+) semble accentuer cette diminution (voir figure 4). Cette forte réduction des globules rouges chez les séropositifs peut être liée aux traitements anti-

rétroviraux. Pendant notre étude la plupart des participants était sous traitement ARV.

L'AZT (Zidovudine, Retrovir) était utilisée par nombre d'entre eux.

Ce type de médicaments peut être à la base d'une insuffisance médullaire, qui pourrait expliquer la diminution des globules rouges. Rivas P *et al* trouvaient que le traitement à la Zidovudine entraînait une diminution des globules rouges (93). De nombreuses autres études ont montré une association de l'anémie avec l'infection par le VIH.

Au Mali, Flavienne D. (76) avait rapporté dans son étude 57,4% de cas d'anémie chez sujets atteints de VIH/Sida. Son résultat est semblable à ceux obtenus au Mali dans d'autres études (77, 78, 79, 94). En Inde, Byomalesh *et al* (95) ont observé 65,5 % de cas d'anémie dans leur population. Ce résultat sur la prévalence de l'anémie est comparable à celui obtenu dans d'autres études en Inde (80, 81).

Les infections bactériennes et fongiques ainsi que certains virus (parvovirus) détruisent la moelle osseuse et peuvent nuire à la production de globules rouges (96, 97). Cela pourrait expliquer la forte diminution des GR chez les tuberculeux latent co-infectés par le VIH observée dans notre étude (figure 4).

A la suite des globules rouges le taux d'hémoglobine était significativement réduit chez les VIH+. Cette réduction était encore plus prononcée lorsque l'infection à VIH est associée à la tuberculose latente (figure 5). Ce résultat est comparable à celui observé par Santis De GC *et al* (98) qui trouvaient que 37.5 % des patients avaient une anémie.

ADETIFIA I.M.O. *et al* trouvaient aussi que l'anémie était la fréquente manifestation hématologique chez les personnes infectées par le VIH. 77.9% des 68 enfants de leur population d'étude étaient anémiés. (87). Sullivan PS *et al*, Perkocha LA *et al* (99, 100) ont obtenu des résultats similaires.

Cependant, aucun cas d'anémie n'a été observé dans notre étude au regard des moyennes du taux d'hémoglobine dans les groupes de comparaison. Les critères d'inclusion de notre étude pourraient expliquer ce résultat. Les participants VIH+ de l'étude étaient sous traitement ARV donc bien suivis et étaient apparemment bien portants. Par ailleurs la petite taille de notre échantillon pourrait expliquer cette observation.

Le pourcentage de l'hématocrite était significativement réduit chez les participants VIH+. La réduction était accentuée avec la tuberculose latente (IDR+) chez ces participants (figure 6). La diminution des globules rouges et du taux d'hémoglobine précédemment observée, confirme ce pourcentage bas de l'hématocrite.

Le volume globulaire moyen (VGM) était significativement plus élevé chez les participants VIH+. L'augmentation du VGM pourrait être due au traitement ARV. Rivas P *et al* (93) ont également observé une augmentation du VGM chez les séropositifs traités à la Zidovudine. Nos résultats sont comparables à ceux observés par d'autres études qui ont rapporté dans certains cas une anémie macrocytaire liée au VIH (94).

La teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine TCMH est significativement plus élevée chez les VIH+ de notre étude.

Par contre, aucune différence significative n'a été observée entre les valeurs de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine CCMH parmi les différents groupes d'étude comparés.

Nos résultats peuvent être comparés à ceux de S. T. Fogue qui rapportait dans son étude que l'anémie microcytaire hypochrome était plus fréquente avec 36%, suivie de l'anémie normocytaire normochrome avec 31% et de l'anémie microcytaire normochrome avec seulement 2% chez les personnes infectées par le VIH (101).

Tcheuffa (102) Diallo *et al* (79) ont observé une anémie normochrome et normocytaire à plus de 50% dans leur étude.

- **Les plaquettes.**

Nous n'avons pas observé de différence dans la comparaison des plaquettes entre les groupes de participants IDR+ et les groupes de participants IDR-.

Par contre les plaquettes étaient significativement plus élevées chez les patients VIH+IDR+ (figure10).

Nos résultats sont différents de ceux de la littérature qui rapportent une thrombopénie au cours de l'infection à VIH. Ghislain avait en effet rapporté dans son étude ; que la thrombopénie s'aggravait de manière significative au long de l'infection par le VIH (94). Selon Coso, elle ne concernerait que 5 à 15% des séropositifs (85). La petite taille de notre échantillon, le stade évolutif de l'infection par le VIH (les participants étaient asymptomatiques), et traitement ARV pourraient expliquer cette différence.

- **Les globules blancs ou leucocytes**

Aucune différence significative n'a été observée en comparant les médianes des leucocytes dans les différents groupes de comparaison (figure11). Cependant, la moyenne des leucocytes chez les patients VIH+ était plus élevée que chez les VIH-. La positivité de l'IDR

associé à l'infection VIH semble augmenter le nombre des leucocytes. Ce résultat est comparable à ceux obtenus par TOUNKARA A., COULIBALY K. (103), qui avaient observé une leucocytose se situant autour de 7200/ml de sang périphérique chez les malades atteints de sida comparés aux donneurs de sang.

✓ **Les monocytes**

Il n'y a pas de différences significatives des pourcentages et des valeurs absolues des monocytes entre nos différents groupes d'étude. La médiane des monocytes en valeur absolue était plus basse chez les patients infectés par le VIH et ayant une IDR positive que les autres groupes (voir figure 13). La tuberculose latente semble induire une diminution des monocytes. Leur implication dans la lutte contre l'infection bactérienne pourrait expliquer cette réduction. La plupart des données de la littérature rapportent une monocytopenie chez les personnes infectées par le VIH. A.A. Oumar *et al* (78) ont obtenu 13.5% de cas de monocytopenie dans leur étude portant sur 200 patients. Tripathi *et al* ont eu un résultat similaire (81). Cet écart de résultats pourrait être dû aux critères d'inclusion de notre étude comme précédemment expliqué.

✓ **Les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles**

Nous n'avons observé aucune différence significative des pourcentages et des valeurs absolues des polynucléaires entre nos différents groupes d'étude (figures : 14 ; 15, 16 ; 17). Nos résultats sont semblables avec ceux de Byomakesh *et al* qui n'ont pas observé de cas de neutropénie dans leur étude (95). Ce qui est contraire aux données habituelles de la littérature qui placent la neutropénie comme la deuxième manifestation hématologique de l'infection par le VIH. Selon Coso, elle est retrouvée chez 60 à 75% des malades du sida, contre 20 à 40% chez les séropositifs (85). Nacoulma E.W.C *et al* ont rapporté une aggravation de la neutropénie due au traitement ARV (AZT) (84).

✓ **Les lymphocytes**

Il n'y a pas de différences significatives des pourcentages et des valeurs absolues des lymphocytes totaux entre nos différents groupes d'étude. Cependant nous avons observé une baisse importante de leur pourcentage chez les participants VIH+IDR+. Les lymphocytes en termes de valeur absolue chez ces mêmes patients confirment cette baisse (figure 19). S.T. Fogue rapporte dans son étude avoir observé une lymphopénie chez les sujets VIH+ (21%) (101). Plusieurs publications vont dans le même sens que Fogue.

Au regard des médianes des lymphocytes de nos groupes d'étude (figure 18, 19), la lymphopénie n'a pas été observée.

- **Les lymphocytes T CD4+**

Nous n'avons pas observé de différence dans la comparaison des lymphocytes T CD4+ entre les groupes de participants IDR+ et les groupes de participants IDR-.

Mais une déplétion significative des pourcentages et des valeurs absolues des lymphocytes T CD4+ a été observée chez les participants infectés par le VIH associé ou non à la tuberculose latente.

La littérature rapporte que la plupart des anomalies observées au cours de l'infection à VIH est due à un déficit à la fois qualitatif et quantitatif des lymphocytes TCD4+. Cette diminution serait étroitement liée à la production virale et corrélée à la progression de l'infection (46).

Ortiz AM *et al* (104) rapportèrent que les LT CD4+ jouent un rôle central dans l'infection à VIH/SIDA. Ils soutinrent que l'épuisement des LT CD4+ au cours de l'infection est caractéristique de la progression de la maladie.

Les participants VIH+IDR+ au cours de notre étude avaient un taux moyen de T CD4+ environ 549 cellules/ $\mu$ l. Ceux qui étaient VIH+IDR- avaient un taux moyen de T CD4+ d'environ 572 cellules/ $\mu$ l. Soit environ 100% des participants infectés par le VIH avaient un taux de T CD4+ >500 cellules/ $\mu$ l (figure 20 ; 21).

Ce résultat est comparable à celui obtenu par Pennap GR *et al* (105) qui rapportait un taux moyen de T CD4+ de 987 cellules/ $\mu$ l. Cependant, la majorité des études tend à montrer le contraire. Ainsi, A.A Oumar *et al* rapportaient dans leur étude que 5% des patients avaient un taux de T CD4 compris entre 200-350 cellules/ $\text{mm}^3$  (78). En Inde PATWARDHAN (106) avait trouvé que 50% de ses patients avaient un taux T CD4 < 200 cellules/ $\text{mm}^3$ .

Ce taux de T CD4+ relativement élevé chez nos participants serait probablement dû aux traitements.

- **Lymphocytes T CD8+**

Nous n'avons pas observé de différence dans la comparaison des lymphocytes T CD4+ entre les groupes de participants IDR+ et les groupes de participants IDR-.

Cependant, contrairement au L T CD4+, les T CD8+ étaient significativement plus élevés chez les participants VIH+ quel que soit le statut de leur IDR (figure 22 ; 23).

En chine Yongjun Jiang *et al* (107) rapportèrent dans une étude que le taux des L T CD8+ chez les VIH+ était plus élevé que chez les VIH- (P=0.05).

D. Koné (108) avait obtenu un résultat semblable ainsi que Sadou (109) a fait les mêmes observations. Il trouvait une augmentation des L T CD8+. L'amplification en pourcentages et en valeurs absolues des L T CD8+ à tous les stades de la maladie sauf en phase terminale de Sida, décrite dans les littératures soutient nos résultats (110, 111).

### **Les lymphocytes B**

Nous n'avons pas observé de différence significative des pourcentages et des valeurs absolues des lymphocytes B entre nos groupes de comparaison (figure 24 ; 25).

Cependant, il est connu que les L B sont aussi touchés par le l'infection à VIH ; ce qui se manifeste par des changements majeurs de leurs sous-populations comme l'hyperactivation et une hypergammaglobulinémie souvent observées (112, 113).

Nos résultats sont aussi différents de ceux obtenus par D. Koné (108) qui observait une chute des L B.

### **Les cellules tueuses naturelles (NK et NKT)**

Nous n'avons pas observé de différence significative en pourcentages et en valeurs des NK et NKT entre nos groupes d'étude. Cependant la valeur absolue des NKT chez VIH+IDR+ était plus bas par rapport aux autres groupes. Les NKT sont des cibles du VIH, ce qui pourrait expliquer cette observation (114, 115).

Van Der Vliet HJJ *et al* (116) observaient que la diminution des NKT semblait se produire dans la première année de l'infection par le VIH avec la séroconversion.

#### **6.2.3. Limites de l'étude :**

- ✓ La petite taille de l'échantillon : ceci est un paramètre important pour les études quantitatives et qualitatives,
- ✓ La difficulté du suivi de l'évolution de la tuberculose latente à la tuberculose active,
- ✓ Les cas rares de co-infection VIH/ Tuberculose latente.

## **7. Conclusion et recommandations**

### **7.1. Conclusion :**

Nous n'avons observé aucune modification significative des paramètres hématologiques et immunologiques liée à la tuberculose latente.

Les modifications observées au cours de notre étude semblent être liées à l'infection par le VIH. Cependant dans un certain nombre de cas elles sont plus prononcées lorsque l'infection à VIH est associée à la tuberculose latente.

### **7.2. Recommandations:**

Nous recommandons les points suivants à l'équipe de recherche du CEREF0/SEREF0 :

- ✓ Etendre la recherche sur un échantillon de plus grande taille,
- ✓ Explorer l'hypersensibilité retardée chez les sujets infectés par le VIH et la tuberculose latente, afin de comprendre la fréquence élevée de la négativité de l'IDR chez les sujets infectés par le VIH,
- ✓ Associer les services d'infectiologie et de la pneumologie pour le suivi des tuberculeux latents infectés par le VIH.



## 8. Bibliographie :

### 1. ONU-SIDA:

Rapport ONUSIDA 2010 sur l'épidémie mondiale de sida.

consultable sur: [www.unaids.org/globalreport/Global\\_report\\_fr.htm](http://www.unaids.org/globalreport/Global_report_fr.htm)

Consulté le 8/09/11

### 2. EDSMIV, CPS/MS.

Enquête Démographique et de Santé. Mali .2006

consultable sur : [www.measuredhs.com/pubs/pdf/FR199/FR199.pdf](http://www.measuredhs.com/pubs/pdf/FR199/FR199.pdf)

Consulté le 8/09/11

### 3. (OMS), Organisation Mondiale de la Santé.

Rapport 2010 sur la lutte contre la tuberculose dans le monde.

Consultable sur : [www.who.int/tb/publications/global\\_2010](http://www.who.int/tb/publications/global_2010)

Consulté le 12/10/11

### 4. Croffon.J, Horn.N, Miller. F.

Tuberculose clinique 2eme édition londres.

Mc Millan Press limited 1999, pp. 56-63.

### 5. OMS.

Aide mémoire n°104 sur la Tuberculose. 2010.

Consultable sur : [www.who.int/tb/publications/global\\_2010](http://www.who.int/tb/publications/global_2010)

Consulté le 12/10/11

### 6. Grosset J., Boisvert H., Truffot-Pernot Ch. .

Mycobactéries;

bactériologie médicale 2e édition chapitre 48. 966P.

### 7. G., Huchon.

Tuberculose et mycobactérioses atypiques.

encyclo. Med chir pneumologie, 6-019-A-33. 1997,

Maladies infectieuses, 8-038-C-10, 20p.

**8. Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C:**

*Tuberculosis.*

**Lancet**, 2003 pp. 362:887-899.

**9. R, Bellamy:**

*Genetic susceptibility to tuberculosis.*

**Clin Chest Med**, 2005, pp. 26:233-246.

**10. Nardell, E:** *Pathogenesis of tuberculosis,*

In L. B. Reichman and E. Hirschfield (ed.), *Lung biology in health and disease,*

New York 1993 pp. 103-123.

**11. Dannenberg, A. M:** *Immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis.*

**Jr.** 1993, *Hosp. Pract*, pp. 28:51-58.

**12. Brennan, P. J:** *Structure of mycobacteria: recent development in defining cell wall carbohydrates and proteins..*

**Rev. Infect. Dis** 1989, 11:S420-S430.

**13. J. Pieters:** *Mycobacterium tuberculosis and the macrophage: maintaining a balance.,* **Cell Host Microbe**. 2008, pp. 3:399-407.

**14. DG., Russell:** *Who puts the tubercule in tuberculosis?,*

**Nat Rev Microbiol** 2007, pp. 5:39-47.

**15. Ulrichs T, Kaufmann SH:** *New insights into the fonction of granulomas in human tuberculosis.,*

**J Pathol** 2006, pp. 208:261-269.

**16. Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V:** *Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophage.*

**Cell** 2004 , pp. 119:753-766.

17. Voskuil MI, Schnappinger D, Visconti KC, Harrell MI, Dolganov GM, Sheman DR, Schoolnik GK: *Inhibition of respiration by nitric oxide induces a Mycobacterium tuberculosis dormancy program.*  
**J Exp Med**, 2003, pp. 198:705-713.
18. AM., Cooper: *Cell-mediation immune responses in tuberculosis.*,  
**Immunol** 2009, pp. 27:393-422.
19. Lillebaek T, Dirksen A, Baess I, Strunge B, Thomsen VO, Andersen AB: *Molecular evidence of endogenous reactivation of Mycobacterium tuberculosis after 33 years of latent infection.*  
**J Infect Dis** 2002, pp. 185:401-404.
20. Dorhoi A, Kaufmann SH: *Fine-tuning of T cell responses during infection.*  
**Curr Opin Immunol** 2009, pp. 21:367-377.
21. Gonzalez-Juarrero M, Turner OC, Turner J, Marietta P, Brooks JV, Orme IM: *Temporal and spatial arrangement of lymphocytes within lung granulomas induced by aerosol infection with Mycobacterium tuberculosis.*  
**Infect Immun** 200, pp. 69:1722-1728.
22. Wolf AJ, Desvignes L, Linas B, Banaiee N, Tamura T, Takatsu K, Ernst JD: *Initiation of the adaptive immune response to Mycobacterium tuberculosis depends on antigen production in the local lymph node not the lungs.*  
**J Exp Med**. 2008, pp. 205:105-115.
23. **Organization, World Health**: *Global tuberculosis control: surveillance, planning and financing.* Geneva, Switzerland, WHO report 2009  
consultable: [www.who.int/tb/publication/global\\_report/2009/pdf/full\\_report.pdf](http://www.who.int/tb/publication/global_report/2009/pdf/full_report.pdf)
24. Harries AD, Dye C.: *Tuberculosis.*  
**Ann Trop Med Parasitol** 2006, pp. 100:415-431.

25. U.Mack, G.B. Migliori, M. Sester, H.L. Rieder, S. Ehlers, D. Goletti, A. Bossink, K. Magdorf, C. Hoßscher, B. Kampmann, S.M. Arend, A. Detjen, G. Bothamley, J.P. Zellweger, H. Milburn, R. Diel, P. Ravn, F. Cobelens, P.J. Cardona, B. Kan, and al: *LTBI: latent tuberculosis infection or lasting immune responses to M. tuberculosis?*, *Eur Respir JI* 2009, pp. 33:956-973.
26. Chan J, Flynn J *The immunological aspects of latency in tuberculosis.* *Clin Immunol*, 2004, pp. 100:2-12.
27. Khader SA, Cooper AM.: *IL-23 and IL-17 in tuberculosis.* *Cytokine* 2008, pp. 41:79-83.
28. Kursar M, Koch M, Mittrucker HW, et al: *Cutting Edge: Regulatory T cells prevent efficient clearance of Mycobacterium tuberculosis.* *J Immunol*, 2007, pp. 178:2661-2665.
29. Ehlers S, Holscher C. *DTH-associated pathology* Kaufmann SH, Steward M, eds.: *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections.* [éd.] *Arnold Publishers.* London, 2004. pp.705-730.
30. **Society, American Thorasic:** *Diagnostic Standards and Classification of Tuberculose in Adults and Children.,* *Am J Respir Crit Care Med* 2000, pp. 161:1376-95.
31. Daniel T. M.: *The immunology of tuberculosis.,* *Clin. Chest Med.* 1980, pp. 1:189-201.
32. Robertson, J. M., D. S. Burtt, K. L. Edmonds, P. L. Molina, C. I. Kiefeand J. J. Ellner: *Delayed tuberculin reactivity in persons of Indochinese origin: implications for preventive therapy.* *Ann. Intern. Med.* 1996, pp. 124:779-784.
33. Harboe, M. : *Antigens of PPD, old tuberculin, and autoclaved Mycobacterium bovis BCG studied by crossed immunoelectrophoresis.* *Am Rev. Respir. Dis* 1981, pp. 124:80-87.

34. **Bass, J., Jr:***The tuberculin test.* Marcel Dekker, New York : L. Reichman and E. Herschfield, editors. Tuberculosis, 1993. pp. 139-148.
35. **Sudre, P., G. T. Dam, and A. Kochi:***Tuberculosis: a global overview of the situation today.*  
**Bull. World Health Org**, 1992, pp. 70:149-159.
36. **Markowitz, N., N. I. Hansen, T. C. Wilcosky, P. C. Hopewell, J. Glassroth, P. A. Kvale, B. T. Mangura, D. Osmond, J. M. Wallace, M. J. Rosen, and L. B. Reichman:***Tuberculin and anergy testing in HIV-seropositive and HIV-seronegative persons.*  
**Ann. Intern. Med.** 1993, pp. 119:185-193.
37. **Tsicopoulos, A., Q. Hamid, V. Varney, S. Ying, R. Moqbel, S. R. Durham, and A. B. Kay:** *Preferential messenger RNA expression of Th1-type cells (IFN-gamma+, IL-2+) in classical delayed-type (tuberculin) hypersensitivity reactions in human skin.*  
**J. Immunol**, 1992, pp. 148:2058-2061.
38. **Cardona P.J:** *New insights on the nature of latent tuberculosis infection and its treatment.*  
**Inflamm Allergy Drug Targets 2007**, p. 6:27:39.
39. **Blumberg HM, Leonard MK Jr, Jasmer RM:** *Update on the treatment of tuberculosis and latent tuberculosis infection.*  
**JAMA**2005, pp. 293:2776-2784.
40. **American Thoracic Society, Centers for Disease Control and Prevention:***Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection.*  
**Am J Respir Crit Care Med** 2000, pp. 161:S221-S247.
41. **Coffin JM.:** *Structure and classification of retroruses.,*  
New York: Plenum, Levy JA, ed. The Retroviridae 1992, pp. 19-50.

- 42. Barré-Sinoussi F.:** *HIV as the cause of AIDS.* .  
**lancet** 1995, pp. 185-238.
- 43. Peterlin BM.:** *Molecular biology of HIV.*  
New York:Plenum Press : Levy JA, ed The retroviridae 1995, pp. 185-228.
- 44. Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S. :** *T-lymphocytes T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV.*  
**Nature**, 1984. pp. 312:767-70.
- 45. Fauci AS.:** *Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implication for therapy.*  
**Science**, 1993. p. 262:104.
- 46. Panlaleo G, Grazioni C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox et al. :** *HIV infection is active and progressive lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease.*  
**Nature**, 1993, pp 362:355-8.
- 47. Paul W.:** *Can the immune response control HIV infection?*  
**Cell**, 1995. pp. 82:177-82.
- 48. Autran B, Hadida F, Haas G:** *Evolution and plasticity of CTL responses against HIV.*  
**Curr Opin Immunol**, 1996. pp. 84:546-53.
- 49. . Levy JA:** *Acute HIV infection and cells susceptible to HIV infection.*  
Levy JA, ed HIV and the pathogenesis of AIDS. 2nd ed.  
Washington DC:ASM Press, 1998, pp. 75-96.
- 50. Gallo RC :** *The first human retrovirus.,*  
**Scientific American** 1986, pp. 255:88-98.
- 51. Barré-Sinoussi F.:** *HIV as the cause of AIDS*, 1996,  
**Lancet**, pp. 348:31-5.

- 52. Roth M, Israel N, Barré-Sinoussi F.:** *Mécanismes de la réplication virale des VIH .,*  
*Med ther* 1996, pp. 2:12-8.
- 53. Girard P. M., Katlama C., Pialoux G.:** *Infection à VIH.*  
Paris : DOIN EDITEURS Groupe Liaisons SA, 2004. pp. 46-50.
- 54. Schacker T, Collier AC, Hughes J, Shea T, Corey L.:** *Clinical and epidemiologic features of primary HIV infection .*  
*Ann Inter Med* 1996, p. 125:257.
- 55. Khan JO, Walker BD.:** *Acute human immunodeficiency virus type 1 infection.*  
*N Engl J Med* 1998, pp. 339:33-9.
- 56. Yeni, Patrick:** *Prise en charge médicale des personnes infectées par le VIH.*  
Paris : Direction de l'information légale et administrative, 2010.  
Consultable sur: [www.sante.gouv.fr](http://www.sante.gouv.fr)
- 57..** Figure de la réplication du VIH  
Consultable sur : [www.snv.jussieu.fr](http://www.snv.jussieu.fr)
- 58. Tamalet C, Lafeuillade A, Fantini J, Poggi C, Yahi N.:** *Quantification of HIV-1 viral load in lymphoid and blood cells: assessment during four-drug combination therapy.*  
*AIDS, 1997.* pp. 11:895-901.
- 59. Mellors JW, Rinaldo CRJ, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA.:** *Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma.*  
*Science, 1996.* pp. 272:1167-70.
- 60. Agut H.:** *Le système immunitaire: un site sanctuaire du VIH? .*  
Actes du colloque Roche 1998: Thérapeutiques et immunité, l'autre combat contre le VIH?

- 61. Chun TW, Davey RT, Jr Engel D, Lane HC, Fauci AS.:** *Re-emergence of HIV after stopping therapy.*  
**Nature**, 1999. pp. 401:874-5.
- 62. Braun J, Plantier JC, Hellot MF et al.:** *A new quantitative HIV load assay based on plasma virion reverse transcriptase activity for the different type, groups and subtypes.*  
**AIDS**, 2003.
- 63. Roseberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, Boswell SL, Sax PE, Kalams SA, Walker BD.:** *Vigorous HIV-1 specific CD4+ T cells responses associated with control of viremia.*  
**Science**, 1997. pp. 278:1447-50.
- 64. (WHO), World Health Organization:** *Global tuberculosis control—epidemiology, strategy, financing.* WHO Report 2009 WHO/HTM/TB/2009.411., 2009.
- 65. Lodha R, Kabra SK:***Newer diagnostic modalities for tuberculosis.*  
**Indian J Pediatr** 2004, pp. 71(3):221–227.
- 66. David ST, Mukundan U, Brahmadathan KN, John TJ:** *Detecting mycobacteraemia for diagnosing tuberculosis.*  
**Indian J Med Res** 2004, pp. 119(6):259–266.
- 67. (WHO), World Health Organization.** *TB/HIV: a clinical manual, 2nd edn.* 2004.  
WHO/HTM/TB2004.329:1-210.
- 68. Kirk O, Gatell JM, Mocroft A, Pedersen C, Proenca R, Brettle RP, Barton SE, Sudre P, Phillips AN, Lundgren JD:** *Infections with Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium among HIV-infected patients after the introduction of highly active antiretroviral therapy.*  
**Am J Respir Crit Care Med** 2000, pp. 162:865–872.



- 69. Havlir DV, Barnes PF:** *Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection.*  
**N Engl J Med** 1999, pp. 340:367–373.
- 70. Lawn SD, Myer L, Orrell C, Bekker LG, Wood R:** *Early mortality among adults accessing a community-based antiretroviral service in South Africa: implications for programme design.*  
**AIDS.** 2005, pp. 19:2141–2148.
- 71. Brizzi MF, Porcu P, Porteri A, Pegoraro L:** *Haematologic abnormalities in the acquired immunodeficiency syndrome Haematological.* 1990, pp. 75(5):454-463.
- 72. Davis BR, Zauli G:** *Effet of immunodeficiency virus infection on hematopoiesis.*  
**Baillieres Clin Heamatol** 1995, pp. 8(1):113-130.
- 73. Aboulafia DM, Mitsuyasu RT:** *Hematologic abnormalities in AIDS.*  
**Hematol Oncol Clin North Am** 1991, pp. 5(2):195-214.
- 74. Taillan B, Roulc, Fuzibet JG, Vinti H, Pesce A, Cassuto JP, Dujardin P:** *Circulating anticoagulants in immunodeficiency virus infection: results of prospective study of 157 seropositive patients.,*  
**Ann Med Interne Paris** 1989, pp. 140(5):405-407.
- 75. Garnier M, Delamare V, Delamare J et Delamare T:** *Dictionnaire des termes de médecine.*  
Paris : Maloine 1999. 573p.
- 76. Djuhou Kamdem, Flavienne:** *Les cytopénies chez les sujets atteints de VIH/SIDA au CHU du Point G.*  
**Thèse de pharmacie** 2007. N°07P59.
- 77. Koudema, Winiga Logtabe :***Effets secondaires des antirétroviraux chez les patients vivants avec le VIH-SIDA.*  
**Thèse de médecine** 2008. N°08M590.

78. **A.A Oumar, S. Dao, D. Goita, D. Sogoba, J.P. Dembele, S.T. Fogue, I.I Maiga:** *Particularités de l'hémogramme de l'adulte atteint de VIH/SIDA en Afrique à propos de 200 cas en milieu hospitalier de Bamako, Mali.* 2009, pp. 128, 2:73-78.
79. **Diallo D, Baby M, Dembele M, Keita A, Sidibé A T, Cissé I A et al:** *Fréquence, facteurs de risque et valeur pronostique de l'anémie associée au VIH/SIDA chez l'adulte au Mali.*  
**Bull Soc Pathol Exot** 2003, pp. 96:123-7.
80. **Kasthuri AS, Sharma S, Kar PK:** *A study of Hematological Manifestation of HIV.,*  
**Indian J Sex Transm Dis** 2006, pp. 27:9-16.
81. **Tripathi AK, Kalra P, Misra R, Kumar A, Gupta:** *Study of bone marrow abnormalities in patients with HIV disease.*  
**N JAPI** 2005, pp. 53:105-10.
82. **Blokmans D, Vermeylen J:** *HIV-related thrombocytopenia.*  
**Act Clin Belg** 1992, pp. 47(2):117-123.
83. **Fezoui H, Garnier G, Taillan B, Cassuto JP, Pesce A:** *Anomalies de l'hémostase et infection par le VIH.*  
**Revue de Médecine Interne** 1996, pp. 17(9):738-745.
84. **E.W.C. Nacoulma, Y. Some, H Tieno, I. Diallo, A. Zoungrana, R. Bougounou, C. Ouédraogo J.B. Guiard-Schmid:** *Evolution des paramètres hématologiques au cours du traitement antirétroviral chez les patients infectés par le VIH au Burkina Fasso.*  
**Bull Soc Pathol Exo** 2007, pp. 100(4):271-274.
85. **Coso D, Gastaut JA:** *Anomalies hématologiques non tumorales au cours de l'infection à VIH.* Paris Arnette initiative. : Sebahoun G: Hématologie clinique et biologique, 1998. pp. pp.305-308.
86. **B., DURAND:** *Anomalies hématologiques au cours de l'infection à VIH.* mars 2005.  
Consultable sur : [www.ispb.univ-lyon1.fr/etudiant/pdf\\_etudiant](http://www.ispb.univ-lyon1.fr/etudiant/pdf_etudiant).

- 87. I. M. O ADETIFA, E. O. TEMIYE, A. O. AKINSULE, V. C. EZEAKA, E. O. IROHA:** *Hamatological abnormalities associated with paediatric HIV/AIDS in Lagos...*  
2006, pp. 121-125.
- 88. Matthew J.Fenton, Mary W.Vermeulen:** *Immunopathology of Tuberculosis: Roles of Macrophages and Monocytes.*,  
**Br. J. Haematol** 1996, pp. p.683-690.
- 89. Ogg G.S., Jin X., Bonhoeffer S., Dunbar P.R., Nowak M.A., Monard S., Segal J.P., Cao Y., Rowland-Jones S.L., Cerundolo V. Hurley A., Markowitz M., Ho D.D., Nixon D.F., McMichael AJ:** *Quantification of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA.*  
**Science** 1998, pp. 279:2103-6.
- 90. Levacher M, Hulstareert F, Tallet F, Ullery S, Pocidalo J, Bach B:***The significance of activation markers on CD8 lymphocytes in human immunodeficiency syndrome: staging and prognostic value.*  
**Clin Exp Immunol** 1992, pp. 90:376-82.
- 91. Douek D.C., Brenchley J.M., Betts M.R., Ambrozak D.R., Hill B.J., Okamoto Y., Casazza J.P., Kuruppu J., Kunstman K., Wolinsky S., Grossman Z., Dybul M., Oxenius A., Price D.A., Koup R.A:** *HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ Tcells.*  
**Nature** 2002, pp. 417:95-8.
- 92. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman.** *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique.*  
**Elsevier Masson**, 2009. pp. p.31-32.
- 93. Rivas P, Gorgolas M, Fernandez-Guerrero ML:***Zidovudine and red-cell distribution width.*  
**N engl J MED** 2005, pp. 2141-2.

- 94. Noumsi Tchuenta, Ghislain.** *Les paramètres de l'hémostase chez les donneurs de sang à Bamako.*  
Thèse de Médecine, 2002. N° 02M126.
- 95. Byomakesh D, Wanchu A, Sachdeva R. K, Sharma A, Das R:** *Profile of hematological abnormalities of Indian HIV infected individuals.*  
**BMC Blood Disorders** 2009, pp. 9-5.
- 96. INSTITUT DE L'ANEMIE.** *VIH/SIDA, Pourquoi l'infection au VIH provoque t-elle l'anémie.* Canada : Institut de l'anémie, rechercher et éducation, 2005.
- 97. LEVINE M A, SCADDEN D T, ZAIA J and KRISHMAN A:** Hematologic aspects of HIV/AIDS. 2001.  
consultable sur : [www.asheducationbook.org](http://www.asheducationbook.org).
- 98. De Santis GC, Brunetta DM, Vilar FC, Brandão RA, de Albernaz Muniz RZ, de Lima GM, Amorelli-Chacel ME, Covas DT, Machado AA:***Hematological abnormalities in HIV- infected patient.* 2011
- 99. Sullivan PS, Beck DT, Rosenberg M, Dobroszycki J:***Depression of blood cell in HIV- infected children and adolescents.,*  
Medical management of AIDS in Children 2003. pp. 321-35.
- 100. Perkocha LA, Rodgers GM:** *Hematologic aspects of human immunodeficiency virus infection: laboratory and clinical considerations.*  
*Am j hematol*, 1988 pp. 29:94-105.
- 101. FOGUE, S.T** *Profil de l'hémogramme chez les sujets VIH/SIDA.*  
Thèse de médecine Mali 2006 N°06M24.
- 102. TCHEUFFA YOUMBI D.,** *Toxicité hématologique des Antirétroviraux chez les personnes vivants avec le VIH suivies dans les services de médecine interne et des maladies infectieuses de l'hôpital du Point G. Bamako 2005.. :*

**Thèse de Médecine Mali, N°05M107**

- 103. TOUKARA A., COULIBALY K., DOUMBO O.** *Exploration de l'immunité non spécifique chez 56 malades atteints de SIDA au Mali..*  
**Médecine Afrique Noire** 1993, 40 (4).
- 104. Ortiz AM, Klatt NR, Li B, Yi Y, Tabb B, Hao XP and al.:***Depletion of CD4+ Tcells abrogates post-peak decline of in SIV-infected rhesus macaques.*  
**J Clin Invest** 2011, pp. 121(11):4433-45.
- 105. Pennap GR, Adoga MP, Forbi JC, Ojobo F, Agwale SM:** *CD4+ lymphocytes reference values of immunocompetente subjects in an African university.*  
**Trop Doct** 2011, pp. 4: 218-21.
- 106. Patwardhan MS, Golwilkar AS, Abhyanka R et al.:***Haematological profil of HIV positive patients.*  
**Indian J Pathol Microbiol** 2002,, pp. 45: 147-50.
- 107. Yongjun Jiang, Shanshan Wu, Fangyuan Zhou, Tristan Bice, Zining Zhang, Jing Liu, Haibo Ding, Xiaoxu Han, Hong Shang:** *Alteration of inhibitory and activating natural killer cell receptor expression on T cells in human immunodeficiency virus infected Chinese.*  
**Microbiology and immunology** 2011, pp. 715-725.
- 108. KONE, D.** *Les sous population lymphocytaire et les cellules NK chez les personnes infectées ou non par le virus de l'immunodéficiency humaine au MALI.*  
**Thèse de Pharmacie, 2007.**
- 109. Sadou K.O.:** *Suivi de l'évolution du taux des lymphocytes T CD4+ chez les patients vivants avec le VIH et qui sont naives de chimiothérapie antirétrovirale à Bamako.*  
Bamako.  
**Thèse de pharmacie. FMPOS., 2007. 49 p. N°50.**

- 110. Janossy G, Autran B, Miedema F. Immunodeficiency in HIV infection and AIDS.**  
Karger, 1991.
- 111. Zaunders J., Carr A., McNally L., Penny R., Cooper DA:** *Effects of primary HIV-1 infection in subsets of CD4+ and CD8+ lymphocytes.*  
AIDS, 1995. pp. 9: 561-6.
- 112. Haas A, Zimmermann K, Oxenius A.** *Antigen-dependent and independent mechanism of T and B cell hyperactivation during chronic HIV-1 infection.,*  
J virol. 2011
- 113. Galanaud P, François B.** *Etude des mécanismes de suppression et de la dysrégulation induit par le VIH.*  
Thèse, 1991. n° 91 PA07 7290 176p.
- 114. Fleuridor R, Wilson B, Runhua h, Landay A, Kessler H, Al- Harthi L.:** *CD1Dd-restricted human natural killer T cells are potent targets for human immunodeficiency virus infection .,*  
Immunology 2003, pp. 108: 3-10.
- 115. Nadine Y. Crowe, Dale I. Godfrey, Alan G. Baxter.:** *Natural killer T cells are targets for human immunodeficiency virus infection.*  
J immunol 2003, pp. 1-2.
- 116. Van Der Vliet HJJ, Von Blomberg BME, Hazenberg MD et al.:** *Selective decrease in circulating Va24\* Vb11\* NKT cells during HIV type1 infection .*  
J immunol 2002 , p. 168: 1490.

## **9. Annexes**

### **GENSCREEN<sup>®</sup> HIV1/2 Version 2**

#### **Principe:**

Genscreen HIV1/2 version 2 est une technique immuno-enzymatique basée sur le principe du sandwich en deux étapes pour la détection des différents anticorps associés aux virus VIH1 et /ou VIH2, dans le sérum ou le plasma humain. Genscreen HIV1/2 repose sur l'utilisation d'une phase solide préparée avec les antigènes purifiés (protéines recombinantes gp160 et p25 du virus VIH1 et peptide mimant l'épitope immunodominant de la glycoprotéine du virus VIH2) et d'un conjugué préparé avec des antigènes marqués à la peroxydase (protéine recombinante nucléocapsidique et peptides mimant les épitopes immunodominant des glycoprotéines d'enveloppe des VIH1 et VIH2).

#### **Materiel :**

#### **La trousse GENSCREEN/ HIV I/II V2 contient:**

##### **Réactif 1 (R1) :** microplaque

Chaque microplaque contient 12 barrettes de 8 cupules sensibilisées par les antigènes purifiés.

##### **Réactif 2 (R2) :** Solution de lavage concentrée 10 fois.

Cette solution doit être diluée 10 fois dans l'eau distillée pour obtenir la solution de lavage prête à l'emploi. On prévoit alors 800 ml pour une plaque de 12 barrettes.

##### **Réactif 3 (R3) :** Sérum de contrôle négatif.

Sérum humain négatif en anticorps anti-VIH 1 et anti-VIH 2, en antigène HBs et en anticorps HCV.

##### **Réactif 5 (R5) :** Sérum de contrôle positif.

Sérum humain positif en anticorps anti-VIH, négatif en Ag HBs et en Ac-VHC.

##### **Réactif 6 (R6) :** Diluant pour échantillons prêt à l'emploi.

C'est une solution de sérum de veau.

##### **Réactif 7a (R7a) :** Conjugué lyophilisé.

Ag VIH 1 et VIH 2 purifiés ; marqués à la peroxydase.

##### **Réactif 7b (R7b) :** Diluant du conjugué

##### **Réactif 8 (8) :** Tampon de substrat.

Solution prête à l'emploi d'acide citrique et d'acétate de sodium PH 4,0 contenant 0,015% d'eau oxygénée et 4% de DMSO.

##### **Réactif 9 (R9) :** Solution de chromogène concentrée.

Diluer 11 fois la solution dans le tampon substrat (Ex : 1 ml de réactif 9 + 10 ml de réactif R8).

**Réactif 10 (R10) :**

Solution d'acide sulfurique 1N prêt à l'emploi.

**Mode opératoire :**

1. Etablir soigneusement le plan de distribution et d'identification des échantillons.
2. Préparer la solution de lavage diluée,
3. Sortir le cadre support et les barrettes (R1)
4. Déposer directement, sans prélavage de la plaque, successivement :
  - 25 µl de diluant dans chaque cupule
  - 75 µl de (R3) en A1
  - 75 µl de (R4) en B1, C1 et D1
  - 75 µl de (R5) en E1
  - 75 µl du premier échantillon en F1
  - 75 µl du deuxième échantillon en G1, etc.
- Homogénéiser le mélange par 3 aspirations au minimum avec la pipette de 75µl
5. Couvrir d'un film autocollant en appuyant bien sur toute la surface.
6. Incuber la microplaque dans un incubateur sec de microplaques pendant  $30 \pm 5$  minutes à  $37 \pm 1^\circ \text{C}$ . Retirer le film adhésif.
7. Aspirer le contenu de toutes les cupules dans un conteneur pour déchets contaminés et ajouter immédiatement 0,370 ml de solution de lavage. Aspirer de nouveau. Répéter le lavage au moins 2 fois (Soit un minimum de 3 lavages au total). Le volume résiduel doit être inférieur à 10 µl. Si l'on dispose d'un laveur automatique, respecter le même cycle opératoire.
8. Distribuer 100 µl de la solution conjugué dans toutes les cupules.
9. Recouvrir d'un film adhésif neuf et incuber  $30 \pm 5$  minutes à la température ambiante ( $18 - 30^\circ \text{C}$ ).
10. Retirer le film adhésif, vider toutes les cupules par aspiration et laver au moins 5 fois comme précédemment.
11. Distribuer rapidement dans toutes les cupules 80 µl de la solution de révélation de l'activité enzymatique (R8 + R9) préalablement préparée. Laisser la réaction se développer à l'obscurité pendant 30 minutes à la température ambiante ( $18-30^\circ\text{C}$ ).



12. Ajouter 100 µl de la solution d'arrêt (R10) en adoptant la même séquence et le même rythme de distribution que la solution de révélation.

13. Essuyer soigneusement le dessous des plaques. Lire la densité optique à 450/620 nm à l'aide d'un lecteur de plaques, dans les 30 minutes qui suivent l'arrêt de la réaction.

14. S'assurer avant la transcription des résultats de la concordance entre la lecture et le plan de distribution d'identification des plaques et des échantillons.

#### **Interprétation des résultats :**

Les échantillons dont les absorbances sont inférieures à la valeur seuil sont considérés négatifs.

Les échantillons dont les absorbances sont égales ou supérieures à la valeur seuil sont considérés initialement positifs d'après le test GENSCREEN HIV1/2 Version 2. Toutefois, les résultats situés juste au-dessous de la valeur seuil doivent être interprétés avec prudence et il est conseillé de tester de nouveau les échantillons correspondants en double.

#### **Limites :**

De très faibles taux d'anticorps peuvent ne pas être détectés lors d'infection récente, en conséquence un résultat négatif signifie que l'échantillon contrôlé ne contient pas d'anticorps détectables par le test Genscreen. Un tel résultat négatif n'exclut pas la possibilité d'une infection VIH1/VIH2. La variabilité des virus VIH1 (groupe M, groupe O) et VIH2 ne permet pas d'exclure la possibilité de réactions faussement négatives. Toute technique ELISA hautement sensible peut produire des réactions faussement positives. Afin de spécifier la réaction, tout échantillon trouvé positif reproductible doit être soumis à un test de confirmation (Western blot par exemple).

#### **NEW LAV BLOT I**

##### **Principe du test :**

Le test repose sur le principe de l'ELISA indirect sur bandelettes de nitrocellulose contenant toutes les protéines constitutives du virus VIH-1 et un contrôle interne anti-IgG. Les protéines du virus VIH-1 inactivée sont séparées en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu dissociant et réducteur, puis électrotransférées sur membrane de nitrocellulose.

La mise en œuvre du test comprend les étapes suivantes :

1. Réhydratation des bandelettes.
2. Incubation des échantillons à confirmer ou sérum de contrôle. Si des anticorps anti-VIH-1 sont présents, ils se lient aux protéines virales reconnues, présentes sur la bandelette.
3. Après lavage, on procède à l'incubation des anticorps anti-IgG humaines marqués à la phosphatase alcaline. Le conjugué se lie aux anticorps anti-VIH1 retenus sur le support solide.
4. Après lavage et élimination du conjugué en excès, la solution de révélation permet de mettre en évidence l'activité enzymatique des complexes liés à la nitrocellulose.
5. L'apparition des bandes colorées spécifiques permet de mettre en évidence la présence anticorps anti-VIH-1 dans l'échantillon.

### **Mode opératoire**

1. Avant utilisation, il est nécessaire d'attendre 30 minutes que les réactifs s'équilibrent à la température du laboratoire (18-30°C). Eliminer le couvercle transparent du rack utilisé. S'assurer que la face des bandelettes comportant le trait de repère et la numérotation sont visibles, afin que les protéines virales présentes sur cette face soient couvertes par les différents réactifs tout au long de la manipulation. Les bandelettes doivent être manipulées précautionneusement à l'aide d'une pince en plastique. Ne pas laisser les bandelettes s'assécher pendant plus de 10 minutes durant le test.

Les contrôles fournis doivent être utilisés en parallèle avec les échantillons pour chaque série de tests. Le contrôle positif est nécessaire pour valider la manipulation et interpréter correctement les bandes.

2. Ajouter 2 ml de solution de lavage/diluant reconstitué dans chaque compartiment. Incuber 5 minutes  $\pm$  1 minute à température ambiante (18-30°C) sous agitation.

3. Ajouter 20 $\mu$ l de chaque échantillon ou sérum dans le compartiment correspondant.

Incuber 2 heures  $\pm$  5 minutes à température ambiante (18-30) sous agitation.

4. Aspirer entièrement le contenu de chaque compartiment à l'aide d'une trompe à vide munie d'un piège contenant un désinfectant (eau de javel à 25%).

Veiller ne pas entraîner la bandelette lors de l'aspiration, utiliser le puits d'aspirations prévues à cet effet. Rincer sous le robinet la pointe d'aspiration en contact avec les

échantillons entre chaque aspiration pour éviter les contaminations inter-échantillons. Laver chaque bandelette avec 2 ml de solution de lavage/diluant reconstitué et l'éliminer immédiatement par aspiration, en respectant les mêmes précautions. Laver 2 autres fois, en contact 5 minutes, sous agitation, chaque bande avec 2 ml de solution de lavage/diluant reconstitué (soit 3 lavage en tout). Eliminer la solution du dernier lavage.

5. Distribuer 2 ml de conjugué par compartiment, la solution de conjugué étant préalablement stabilisée à température ambiante.

6. Lavage : procéder comme en 4.

7. Distribuer 2 ml de solution de révélation par compartiment. En présence de particules en suspension laisser décanter dans le flacon avant pipetage (ces particules n'interfèrent pas dans le test). Incuber sous agitation et surveiller la coloration. Toutes les bandes correspondant aux protéines virales doivent être visualisées avec le sérum de contrôle positif. (Temps de révélation minimum 5 minutes).

8. Arrêter la réaction en éliminant la solution de révélation et en rinçant les bandelettes 3 fois à l'eau distillée.

9. Sécher les bandelettes entre 2 feuilles de papier absorbant à température ambiante (18-30°C). Classer les bandelettes à l'aide du trait de repère. Valider puis interpréter.

**Attention :** Ne pas coller de plastique adhésif sur la partie de la bande correspondant aux protéines virales.

### **Validation lecture et interprétation des résultats**

**Validation :** La bande du contrôle anti-IgG doit être présente avec une coloration forte, elle permet de valider l'addition de l'échantillon, des réactifs et du bon fonctionnement du mode opératoire. L'absence ou la faible intensité de coloration de la bande du contrôle interne anti-IgG traduit soit une absence de dépôt d'échantillon ou de réactifs, soit un non-respect du protocole opératoire.

**Lecture :** la présence d'anticorps anti-protéines constitutives du virus VIH1 dans les échantillons contrôlés se traduit par l'apparition de bandes spécifiques colorées (bleu violet). Leur position correspond aux masses moléculaires des protéines virales répertoriées dans le tableau suivant :

**Tableau 2 : Protéines constitutives du VIH-1 et leur aspect au New Lav Blot I.**

Dénomination	Génome	Nature	Aspect en Western Blot
GP160	ENV	Glycoprotéine précurseur de la GP110/120 et de la GP41	Bande nette
GP 110/GP 120	ENV	Glycoprotéine d'enveloppe	Bande aux bords diffus
P68/66	POL	Transcriptase inverse	Bande nette
P55	GAG	Précurseur de protéines internes	Doublet
P52/51	POL	Transcriptase inverse	Bande nette
GP41	ENV	Glycoprotéine transmembranaire	Bande diffuse
P40	GAG	Précurseur de protéines internes	Bande diffuse
P34/31	POL	Endonucléase	Bande nette
P24/25	GAG	Protéine interne	Bande nette
P18/17	GAG	Protéine interne	Parfois doublet

**Interprétation**

**Tableau 2 : Interprétation des résultats du New Lav Blot I.**

Interprétation	Profil
Positif	2ENV ± GAG ± POL
Indéterminé	ENV ± GAG± POL GAG+POL GAG POL
Négatif	Aucune bande Bandes non répertoriées

## NOTE

- La rubrique << indéterminé >> peut faire suspecter une des alternatives suivantes :  
Séroconversion, VIH2 ou réaction croisée avec d'autres rétrovirus.

- Les profils positifs ou indéterminés peuvent être obtenus par contamination avec un sérum positif.

L'utilisation d'autres critères d'interprétation est également possible. C'est ce qui est préconisé en Allemagne par l'association allemande pour la lutte contre les maladies virales (DVV) [positif : présence au minimum d'une protéine d'enveloppe et d'une protéine Gag ou Pol-indéterminé correspond à tout profil ne répondant pas aux critères ci-dessus – Négatif : aucune bande présente. Dans ce cadre les gp120/gp160 sont considérées comme une seule protéine].

## Limites du test

- Un respect total de la procédure technique est nécessaire pour l'obtention d'une performance optimale.
- Le contrôle doit être utilisé en parallèle avec les échantillons pour chaque série de tests. Il est nécessaire pour valider la manipulation et interpréter correctement les bandes.
  - Un test de dépistage positif associé à un test de confirmation négatif peut se produire durant le premier stade de l'infection ; en conséquence, un résultat négatif indique que l'échantillon testé ne contient pas d'anticorps anti-VIH détectable par le NEW LAV BLOT I. Toutefois, un tel résultat ne permet pas d'exclure la possibilité d'une infection récente VIH1/VIH2. Un nouvel échantillon ultérieur est recommandé
- La variabilité des virus VIH1 et VIH2 ne permet pas d'exclure la possibilité de réactions faussement négatives.
- L'utilisation des critères d'interprétation moins restrictifs peut induire une classification différente des échantillons. Certains échantillons classés indéterminés selon les critères de la notice seraient alors rendus positifs.
- Un profil « indéterminé » doit conduire à ne pas exclure une des situations suivantes :  
séroconversion, VIH2 ou réactions croisées avec d'autres rétrovirus.

### **Critères de diagnostic sérologique de l'infection à VIH**

Conformément aux recommandations de l'O.M.S, les différents tests de dépistage du VIH doivent se faire par deux tests utilisant deux antigènes différents à défaut de la confirmation par le Western Blot.

Le premier test a été fait par le test ELISA = GENSCREEN HIV1/2 Version 2.

Le deuxième test a été fait par le Western blot test qui permet d'identifier en plus, le type de virus en cause (VIH-1 ou VIH-2 ou VIH 1+2).

Le diagnostic de séropositivité est donc posé par :

- Genscreen positif
- Western blot positif en VIH-1 ou VIH-2 ou VIH 1+2.

### **Immunophénotypage**

#### **Matériel et réactifs :**

- Une solution de FACS lyse (10x) utilisée au 1/10<sup>ème</sup> comme solution de travail.
- Un sang de contrôle
- Des anticorps monoclonaux :

#### **Compensation :**

Tube-1 : Unstain (non marqué)

Tube2 :CD8 FITC.....20 µl

Tube-3 :CD8 PE.....20 µl

Tube-4 :CD8 Percp Cy5.5.....20 µl

Tube-5:CD8 APC.....5µl

#### **Routine :**

Tube-1:CD3/CD8/CD45/CD4.....20 µl

Tube-2:CD3/CD16, 56/CD45/CD19.....20µl

Ces anticorps sont couplés respectivement aux fluorochromes : FITC, PE, Percp Cy5.5, APC.

- Des tubes en polystyrène de dimensions 12x75 mm
- Des Multi-pipettes de type Eppendorf®
- Des aspirateurs
- Des pipettes sérologiques à volumes ajustables
- Du coton tige
- Des compresses non stériles
- Un bécher en plastique

- De l'eau distillée
- Une solution de PBS (phosphate Buffered Saline) sans Ca<sup>++</sup> sans Mg<sup>++</sup>
- Une solution de lavage (BD Wash).

### **Mode opératoire**

- 1- Agiter le sang recueilli sur tube EDTA pendant 1 à 2 minutes.
- 2- Ajouter soigneusement 100 µl de sang total lavé deux fois avec du PBS à chaque tube contenant des anticorps monoclonaux. Lors de l'ajout éviter d'y former des bulles d'air et ou faire des tâches sur les parois des tubes.  
Les éventuelles tâches de sang peuvent être éliminées par du coton tige.
- 3- Agiter soigneusement ; couvrir avec du papier aluminium et incuber à l'obscurité pendant 15 minutes et à la température ambiante.
- 4- A chaque tube ajouter 2 ml de solution de lyse (FACS lyse) et agiter immédiatement pendant 3 secondes 4 à 5 fois.
- 5- Couvrir de papier aluminium et incuber 10 minutes à l'obscurité et à la température ambiante.
- 6- Après incubation centrifuger à la vitesse de 1200 tours/ minute pendant 5 minutes à la température de 20- 25°C.
- 7- Enlever le surnageant
- 8- Agiter soigneusement
- 9- Ajouter 2 ml de solution de lavage et agiter immédiatement.
- 10-Centrifuger ensuite à 1200 tours/ minute pendant 5 minutes à la température de 20- 25°C. Enlever le surnageant.
- 11-Ajouter 200 µl de solution de lavage (BD Wash) et analyser immédiatement les échantillons au FACScalibur®.

### **✓ L' hémogramme ou la numération formule sanguine**

#### **Principe**

La numération sanguine consiste à compter les différents éléments cellulaires du sang à savoir : globules blancs (ou leucocytes), globules rouges (ou hématies) et plaquettes sanguines. Elle permet aussi de mesurer les paramètres liés à ces éléments. Tels que le taux d'hémoglobine, volume globulaire moyen = VGM ou de calculer l'hématocrite, la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine = TCMH, la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine = CCMH. Elle est faite grâce à l'analyseur de AcT Diff (automate).

## **Réalisation de numération formule sanguine**

### **Equipements**

1. Deux Coulter Ac \* T Diff Analyseurs (P/N 6706366).  
Coulter 1 S/N: AG32728; Coulter 2 S/N: AG37923.
2. Une imprimante graphique : OKI Microline 3390,24 imprimante Pin, (P/N 899820220)

### **Principe de fonctionnement de Coulter Ac \* T Diff Analyseurs**

La fonction de l'instrument est basée sur la méthode Coulter. La méthode Coulter permet de détecter et de mesurer les variations de résistance électrique quand une particule dans un liquide conducteur, passe à travers une petite ouverture. Comme chaque particule passe à travers l'ouverture, il empêche le courant et provoque une impulsion mesurable. Le nombre d'impulsions indique le nombre de particules. La hauteur de chaque de chaque impulsion est proportionnelle au volume de cette particule.

### **Directives de prélèvement.**

A- Le sang périphérique est recueilli dans des tubes EDTA contenant un anticoagulant (K3 EDTA). Les anticoagulants K2EDTA et Na2EDTA peuvent également être utilisés. L'utilisation de tout autre anticoagulant est inacceptable.

B- Les échantillons de sang hémolysé sont inacceptables. Si l'échantillon de sang est hémolysé, il doit être rejeté, et des mesures doivent être prises pour obtenir un autre échantillon de sang.

C- L'échantillon de sang doit être sans caillots.

Chaque échantillon de l'étude doit être vérifié avant analyse comme suit :

- a) Retirer délicatement le bouchon du tube de sang en utilisant un morceau de gaze. Poser le bouchon sur une feuille séparée de gaze sur la paillasse de laboratoire.
- b) En tenant le tube d'une main de l'autre, prendre 2 bâtons applicateurs en bois et les mettre soigneusement dans le tube de prélèvement sanguin.
- c) Mettre doucement le bâton applicateur au fond du tube.



d) Agiter les 2 bâtons applicateurs dans le sang, et faire des mouvements du sommet du tube vers le bas avec les bâtons. Répéter cette action plusieurs fois, tout en observant si oui ou non il y a des caillots sur les bâtons.

e) Si les caillots sont présents, l'échantillon de sang doit être rejeté, et un autre prélèvement doit être fait.

D- Avant l'analyse, l'échantillon de sang doit être stabilisé et laissé au repos au moins 20 minutes après la collecte.

E- L'échantillon de sang doit être analysé dans les 24 heures suivant le prélèvement. Des échantillons de sang de plus 24 heures ne sont pas valables.

F- Ne pas réfrigérer l'échantillon de sang.

G- Maintenir l'échantillon de sang entre 16°C et 35°C.

H- Le volume de l'échantillon aspiré :

a. 12 µL de sang est nécessaire lorsque l'échantillon est utilisé en mode total.

b. 735 µL de sang pré-dilué est nécessaire lorsque l'échantillon est utilisé en mode d'analyse pré-dilution.

### **Consignes de sécurité.**

#### **1. Risques électriques :**

Il y a un risque de blessure par choc électrique.

Pour éviter cela, ne pas toucher à l'instrument.

#### **2. Risques biologiques :**

a) Utiliser les précautions universelles.

b) Considérer tous les matériels (échantillons, réactifs contrôles, calibrateurs, etc.) comme potentiellement infectieux.

c) Eviter tout contact inutile avec la sonde et la zone de la sonde. La sonde peut contenir des matières infectieuses.

d) Fermer tous les pores de l'instrument et le couvrir.

- e) Le Diff Analyser peut être décontaminée en essuyant les surfaces extérieures à l'éthanol 70%, au méthanol ou Isopropanol.
- f) Pour la gestion des déchets, il faut veiller à ce que les déchets liquides soient décontaminés avec l'eau de Javel à 10% pendant au moins 30 minutes. Une fois traités, les déchets peuvent être jetés dans l'évier de laboratoire suivi par de grandes quantités d'eau.
- g) Tous les échantillons de sang doivent être manipulés comme s'ils étaient potentiellement infectieux.
- h) Equipement de protection individuelle (gants, blouses, blouses de laboratoire, des lunettes de sécurité, des chaussures) sont obligatoires.
- i) Toute manipulation pouvant causer des éclaboussures, doit être effectuée à l'intérieur du cabinet de sécurité biologique ou derrière une barrière en plexiglas.
- j) Eliminer tous les déchets contaminés dans des poubelles appropriés pour déchets biologiques dangereux.

## **FICHE SIGNALÉTIQUE**

**Nom :** TOGO

**Prénom :** Sylvestre

**Téléphone :** 66 80 51 38

**E-mail :** sylvestretogo@yahoo.fr

**Titre de la thèse :** Les paramètres hématologiques et immunologiques dans la tuberculose latente chez les personnes co-infectées par le VIH.

**Année :** 2010 – 2011

**Pays :** Mali

**Ville de soutenance :** Bamako

**Lieu de dépôt :** Bibliothèque de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie.

**Secteur d'intérêt :** Immunologie, virologie, bactériologie, infectiologie.

### **Résumé :**

Nous avons exploré le profil des paramètres hématologiques et immunologiques chez 39 participants repartis en 4 groupes au regard de leur sérologie VIH et le statut de l'IDR pendant 1an. L'échantillon était constitué de 10 témoins (VIH-/IDR-), de 13 tuberculeux latents non infectés par le VIH (VIH-/IDR+), de 5 co-infectés VIH/TB latente (VIH+/IDR+) et de 11 séropositifs non tuberculeux latents (VIH+/IDR-).

Les lymphocytes ont été marqués par deux cocktails d'anticorps monoclonaux et dénombrés par la cytométrie de flux. L'hémogramme a été réalisé par la méthode de coulter et complété par la lecture de frottis.

Les résultats ont permis d'observer :

- Une diminution significative des globules rouges chez les participants VIH+, elle était plus prononcée les chez VIH+/IDR+. Le taux d'Hb était de 10,6 g/dl chez les tuberculeux latents infectés par le VIH.
- Le nombre de plaquettes était significativement plus élevé seulement que chez tuberculeux latents infectés par le VIH.
- Le taux de CD4+ était significativement plus bas chez VIH+ mais les CD4+ > 500 cellules/mm<sup>3</sup> : les participants étaient asymptomatiques.
- Les modifications observées semblent être dues par l'infection VIH qu'a la TB latente.

## Sheet

**First Name:** TOGO

**Name:** Sylvester

**Phone:** 66 80 51 38

**E-mail:** sylvestretogo@yahoo.fr

**Thesis title:** Immunological and hematological parameters in latent TB in people coinfectd with HIV.

**Year:** 2010 - 2011

**Country:** Mali

**Town of defence:** Bamako

**Discharge point:** Library of the Faculty of Medicine, Pharmacy and odontostomatology.

Sector of interest: Immunology, virology, bacteriology, infectious diseases.

### Summary:

We explored the profile of hematological and immunological parameters in 39 participants divided into four groups with regard to their HIV status and the status of the IDR for 1 year. The sample consisted of 10 controls (VIH-/IDR-), 13 latent tuberculosis uninfected with HIV (VIH-/IDR +), 5 co-infected HIV / latent TB (HIV + / TST +) and 11 HIV-positive not latent TB (HIV + / TST-).

Cells were stained by two monoclonal antibodies cocktail and counted by flow cytometry.

The blood count was performed by the coulter method and supplemented by the reading of smears.

The results:

- A significant decrease in red blood cells in HIV + participants, it was more pronounced in the HIV + / TST +. The Hb was 10.6 g / dl in co-infected.
- The number of platelets was significantly higher only in HIV + / TST +.
- The rate of CD4 + was significantly lower in HIV + but CD4 + > 500 cells/mm<sup>3</sup>.
- The observed changes appear to be caused by HIV infection has latent TB.

## **SERMENT DE GALIEN**

**Je jure en présence des maîtres de cette Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples**

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;**
- d'exercer dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;**
- de ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ;**
- en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.**

**Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.**

**Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.**

**Je le jure.**