

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLAB -BLIDA
FACULTE DES SCIENCES AGRO-VETERINAIRES ET BIOLOGIQUES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
MEMOIRE DE FIN D'ETUDE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER EN
SNV
FILIERE: BIOLOGIE

Option : Microbiologie/Bactériologie

Immunophenotypage des lymphocytes T au cours de l'infection à VIH

Présenté par :
BENTERKIA Nawel

Devant le jury composé de :

Noms et prénoms	Grade	Lieu d'exercice	Qualité
Mr. Mohamed Said R	MAA	USDB	Président
Mme. Aissani R	MAA	USDB	Examinatrice
Mlle. Radi N	MAB	USDB	Examinatrice
Mr. Meddour Y	MAA	HCA	Promoteur
Mr. Benyahia N	MAA	USDB	Co-promoteur

Promotion 2012/2013

Introduction

Le Syndrome d'Immunodéficience Acquisée, ou SIDA, est une maladie infectieuse qui détériore le système immunitaire, les personnes atteintes de ce syndrome deviennent, au stade avancé de l'infection, immunodéprimées.

Cette infection est causée par un virus de la famille des rétroviridae, sous famille Orthoretrovirinae, c'est le Virus de l'Immunodéficience Humaine, deux types sont connus : le VIH-1 et le VIH-2.

Le suivi des changements dans les populations de cellules immunitaires tels que les lymphocytes, monocytes et cellules dendritiques au cours de maladies infectieuses comme l'infection au VIH est crucial.

Il y'a différentes techniques d'immunophenotypage: l'immunofluorescence in situ, l'immunohistochimie et la cytométrie en flux.

Grâce à la cytométrie en flux, il est maintenant possible de mesurer et d'analyser simultanément de multiples paramètres qualitatifs et quantitatifs à l'échelon cellulaire dans une population hétérogène en suspension.

L'objectif de ce travail consiste en le suivi de l'évolution de l'infection en fonction de la charge virale, et l'immunophenotypage des lymphocytes T et leurs marqueurs d'activation, pour le monitoring thérapeutique des patients.

Immunophénotypage des lymphocytes T au cours de l'infection à VIH

I. Généralités:

1-Historique et Epidémiologie:

Les premiers cas d'infections à VIH remontent au début des années 1960, chez des macaques rhésus du New England Primate Research Center. Le virus fut introduit par des signes rhésus provenant d'un centre en Californie.

L'épidémie se développe à bas bruit au cours des années 1970, la véritable histoire médiatique du SIDA débute en Juin 1981. Deux virus ont été isolés, le premier a été nommé LAV par les français et le second HTLV III par les américains .

Il a été découvert par la suite que ces deux virus étaient le même, une nomenclature universelle a donc été adoptée; VIH, des scientifiques des Etats-Unis faisaient état des premiers cas cliniques d'une maladie qui allait devenir le syndrome de l'immunodéficience acquise, ou SIDA. Vingt ans plus tard, l'épidémie s'est propagée . Plus de 34 millions de personnes vivent avec le VIH/SIDA de par le monde chaque année 2,5 millions de personnes sont nouvellement infectées et on note 1,7 million de décès.

L'Afrique subsaharienne reste l'une des régions les plus gravement touchées , avec près d'un adulte sur vingt (4,9 %) vivant avec le VIH, elle représente à elle seule 69 % des personnes vivant avec le VIH dans le monde (Tableau1). La prévalence régionale de l'infection à VIH est près de 25 fois plus élevée en Afrique subsaharienne qu'en Asie mais environ 5 millions de personnes vivent avec le virus dans l'ensemble de l'Asie du Sud, du Sud-Est et de l'Est. Après l'Afrique subsaharienne, les régions les plus fortement touchées sont les Caraïbes, l'Europe de l'Est et l'Asie centrale, où 1 % des adultes vivait avec le VIH en 2011[31]. L'Algérie avec une séroprévalence de l'infection à VIH de l'ordre de 0,1 %, est considérée par l'ONUSIDA comme un pays à profil épidémiologique bas.[**Adrian B et al. Johan Klass. Lambotte O et al. Rapport ONUSIDA 2012**].

Le premier cas de SIDA notifié en Algérie a été diagnostiqué en décembre 1985. Jusqu'au 31 décembre 2011, le nombre cumulé a atteint 6797 cas d'infections à VIH dont 1272 cas de sida et 5525 cas de séropositivité asymptomatique avec comme sérotype le VIH1 à plus de 99%. Même si ces chiffres ne reflètent que partiellement l'ampleur de l'épidémie VIH en raison d'une sous déclaration au Laboratoire National de Référence, le nombre de nouveaux diagnostics est en constante augmentation, surtout ces dernières années, en moyenne 600 à 700 cas par an.

Immunophénotypage des lymphocytes T au cours de l'infection à VIH

La transmission sexuelle reste la principale voie par laquelle les personnes contractent le VIH (97,5 %). La tranche d'âge la plus touchée est celle des 25 – 49 ans avec un sexe ratio de 1,36. **[Rapport d'activité sur la riposte nationale au SIDA Algérie 2012]**

2-Définitions:

2-1.L'infection à VIH et ces voies de transmission:

L'infection à VIH détériore le système immunitaire. Les personnes infectées par le VIH peuvent vivre des années sans signes apparents de maladie, ils sont séropositifs.

Le SIDA est le stade avancé d'une infection par le VIH. Les personnes qui sont à ce stade deviennent immunodéprimées. Les causes de décès les plus fréquentes sont la tuberculose, la pneumonie, les affections diarrhéiques ou certains cancers. Chez l'adulte, le SIDA se développe en moyenne 7 à 10 ans après l'infection par le VIH. Chez les jeunes enfants, la maladie se développe généralement plus rapidement.

Le VIH se transmet des façons suivantes :

- Lors de rapports sexuels non protégés (cause principale des infections)
- Par transfusion de sang contaminé par le VIH
- Toxicomanies
- par l'intermédiaire d'aiguilles ou de seringues contaminées ou mal stérilisées, en milieux hospitalier
- De la mère à l'enfant pendant la grossesse, lors de l'accouchement ou lors de l'allaitement. **[Lambotte O et al.Rapport d'activité sur la riposte nationale au SIDA Algérie 2012]**

2-2.L'agent infectieux:(Nomenclature et classification)

- Les VIH appartiennent au groupe des rétrovirus, lesquels ont été identifiés dans de nombreuses espèces de mammifères, incluant les lentivirus, les oncovirus et les spumavirus. Ce sont des virus enveloppés, à ARN qui possèdent une reverse-transcriptase. Cette enzyme spécifique permet de transformer l'ARN viral en ADN double brin (provirus) lequel peut s'intégrer dans le chromosome de la cellule et induire une infection définitive de l'organisme.
- Les VIH font partie des lentivirus responsables d'infections persistantes à évolution lente. Les oncovirus sont aussi des rétrovirus responsables de diverses pathologies animales. Le Virus

Immunophénotypage des lymphocytes T au cours de l'infection à VIH

d'Immunodéficience humaine (VIH) est un rétrovirus, sous famille: Orthoretrovirinae, faisant partie du sous-groupe des lentivirus. **[Rapport synthétisé des notifications des cas des MST/SIDA, BCC/SIDA, RDC 2000]**

- On le retrouve dans différents liquides du corps, comme le sang le sperme, sécrétions vaginales ainsi que dans le lait maternel.
- C'est un virus possédant un ARN+ monocaténaire (Figure 2). Il est de petite taille, deux types sont actuellement connus, à 50% d'homologie de l'information génétique; le VIH-1 le plus commun (Europe, Amérique, Asie, Afrique) et le VIH-2 (Afrique de l'Ouest).
- **La diversité génétique:**

Elle est importante à souligner car elle constitue un obstacle majeur à la constitution d'un vaccin préventif et peut poser des problèmes de diagnostic et de prise en charge thérapeutique. On distingue deux groupes de VIH : les VIH-1 proches des virus des chimpanzés africains et comprenant les VIH – 1 groupe M, groupe O et groupe N. Ce sont les VIH-1 groupe M (major) qui sont largement dominants avec une grande diversité génétique au sein de ce groupe incluant les principaux sous-types (de A à K), tous présents en Afrique. De plus, de nombreux virus recombinants sont régulièrement identifiés et caractérisés ; ils sont particulièrement présents en Afrique dont ils sont aussi originaires et peuvent donc être identifiés chez les sujets d'origine africaine vivant en France. Alors que le sous-type B du groupe M est majoritaire en Europe et aux Etats-Unis, le sous-type C est dominant dans le monde du fait du développement très important de l'épidémie en Afrique sub-saharienne. Les VIH-2 proches des virus des singes mangabey montrent aussi une grande diversité, mais celle-ci est moins forte que celle des VIH-1, sans doute du fait d'un moindre pouvoir pathogène des VIH-2 et donc d'une extension relativement plus faible de cette épidémie. La plupart des sujets infectés par le VIH-2 sont d'origine africaine (Afrique de l'Ouest).

Immunophénotypage des lymphocytes T au cours de l'infection à VIH

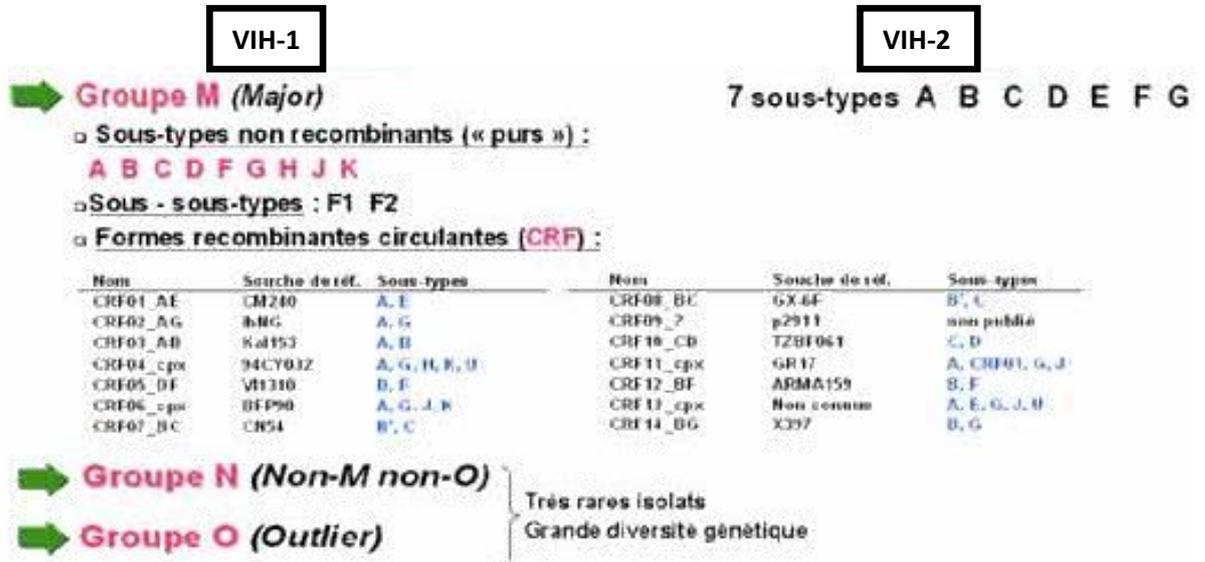


Figure1 : Diversité génétique des VIH(McCutchan FE AIDS,2000,14(suppl3): S14-31)

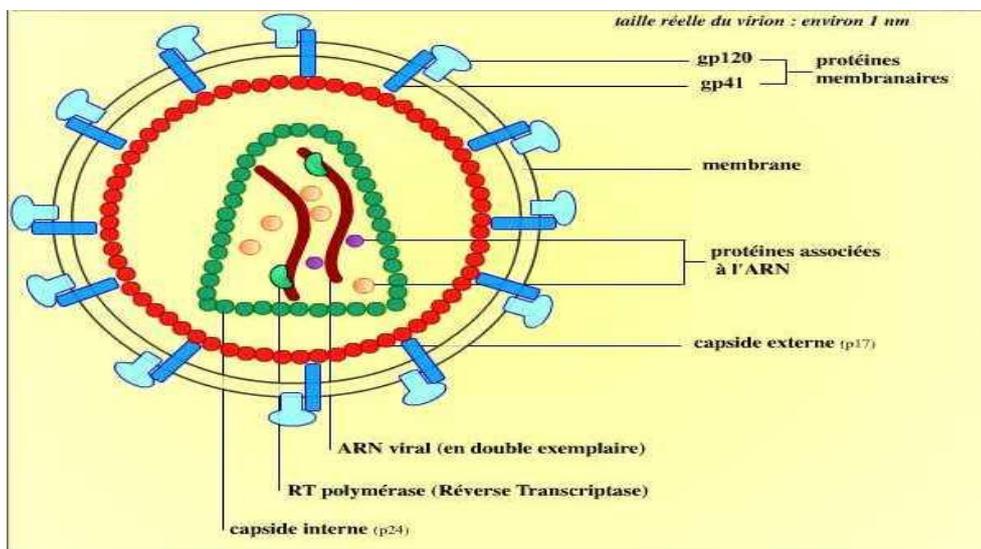


Figure2: Structure du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Membrane, capside externe, capside interne. Transcriptase inverses(2 exemplaires), ARN: acide ribonucléique(2 exemplaires). glycoprotéine membranaire gp120 et gp41

Malgré sa grande variabilité génétique, on retrouve sur la molécule d'ARN trois gènes principaux communs à tous les autres rétrovirus :

Immunophénotypage des lymphocytes T au cours de l'infection à VIH

- Le gène gag (responsable de la synthèse des protéines de capsid et du core)
- Le gène pol (pour la transcriptase inverse, l'intégrase et la protéase virale)
- Le gène env (pour les protéines de l'enveloppe)

Des glycoprotéines externes sont ancrées à l'enveloppe, gp120 pour le VIH-1 et gp125 pour le VIH-2, et des glycoprotéines transmembranaires gp41 pour le VIH-1 et gp36 pour le VIH-2. La capsid virale est de forme allongée, sous forme de trapèze au centre de la particule virale (Figure 2) elle est constituée par une protéine interne majeure la p24 dont le poids moléculaire est de 24.000 Kda pour le VIH1 et la p26 dont le poids moléculaire est de 26.000 Kda pour le VIH2.

C'est à l'intérieur de la capsid que sont présentes les protéines de la nucléocapsid, les enzymes (reverse transcriptase et intégrase) et les deux molécules d'ARN à polarité positive.

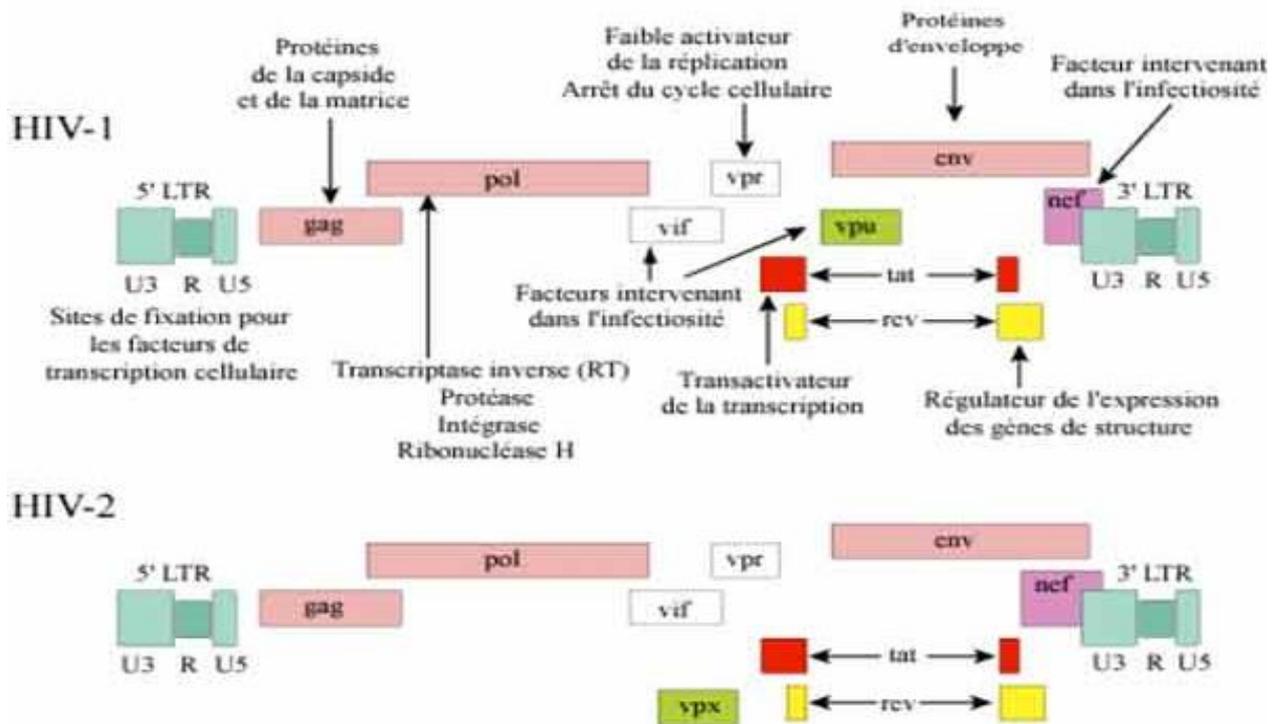


Figure 3: Structure génomique des provirus VIH-1 et VIH-2

2-3. Les cellules cibles du VIH:

Ce sont les cellules porteuses à leur surface de la molécule CD4, ayant une haute affinité avec la gp120, on retrouve parmi elles les lymphocytes T CD4+, les monocytes-macrophages, les cellules folliculaires dendritiques, les cellules de Langerhans cutanées et les cellules microgliales cérébrales. Pour les lymphocytes T CD4+ le corécepteur est le CXCR4, pour les cellules présentatrices d'antigènes c'est le CCR5. [Johan K. 2012, Mariani et al 2010].

Immunophénotypage des lymphocytes T au cours de l'infection à VIH

Les lymphocytes T CD4 (ou LT4), appelés aussi lymphocytes T helpers (Th) ou T auxiliaires, sont les cellules responsables de la coordination et de l'activation de la réponse immunitaire. Ces cellules sont produites par la moelle osseuse et subissent leur maturation au niveau du thymus et possèdent des protéines CD4 sur leurs membranes. Ces cellules helpers, sont la clef du système immunitaire, elles aident au déclenchement de la réaction et de la réponse immunitaire en cas d'infection, c'est à dire l'activation des LTCD8, des macrophages, et la production des cytokines. Après contact avec un antigène, les LTCD4 s'activent, entrent en prolifération et orientent la réponse immunitaire vers une immunité dite à médiation cellulaire (stimulation des lymphocytes T cytotoxique) pour une destruction directe des cellules infectées ou une immunité dite à médiation humorale pour une production d'anticorps. En détruisant les LTCD4, le VIH inhibe le mécanisme de défense immunitaire à sa source. L'activation des LTCD4 se transmet par l'expression de molécules de surface:

1. **CD38 (cyclic ADP ribose hydrolase)**

Le CD38 a été identifié au début des années 80 ,c'est une glycoprotéine de surface de types II, de poids moléculaires de 45 kda ,comportant une seule région transmembranaire et un long domaine extracellulaire.Le CD38 est exprimé par une large population de leucocytes à différents stades.(Tableau 1).Il est exprimé fortement par les lymphocytes T durant les phases de différenciations cellulaires et durant l'activation des cellules T in vivo, c'est également le cas lors d'infections virales incluant l'infection à VIH

2. **HLA-DR (CMH classe II)**

L'HLA-DR est un alpha/beta heterodimère ,et un récepteur cellulaire de classe II. Chacune des deux sous unités comprend deux domaines extracellulaires et une queue cytoplasmique, les deux chaînes sont ancrées à la membrane. Les molécules HLA-DR sont des marqueurs précoces d'activation des LT CD4 (Absent au repos).

Immunophénotypage des lymphocytes T au cours de l'infection à VIH

		CD3	CD4	CD8	CD16	CD19	CD56	HLA-DR	CD38
LT	Aux	++	++					+ si activée	+ si activée
	Cyt	++		++				+ si activée	+ si activée
LB						++		++	++
NK					+ ou -		++		+

Tableau1: Principaux marqueurs des leucocyte(LT=Lymphocytes T, LB=Lymphocytes B, NK=Natural Killer, Aux= Auxiliaires, Cyt= Cytotoxique. + : présence, - : absence)

3-Diagnostic virologique:

En biologie médicale, le diagnostic de l'infection à VIH est surtout sérologique chez l'adulte. Il est basé sur la détection d'anticorps (Ac) synthétisés par l'organisme contre les antigènes (Ag) ou protéines de structure du VIH. Ces anticorps, selon les techniques, peuvent être recherchés dans le cadre d'un dépistage de routine ou d'une confirmation du diagnostic. Le dépistage des anticorps anti VIH est obligatoire pour les donneurs de sang, d'organes ou de sperme depuis le premier août 1985. Les tests de dépistage habituellement utilisés font appel aux réactions immuno-enzymatiques (ELISA ou EIA), aux réactions d'agglutination ou aux tests rapides.

3-1. Critères diagnostiques:

1/ Clinique :

▪ Primo-infection

Le virus se multiplie en grandes quantités dans les ganglions lymphatiques qui deviennent palpables cliniquement et des quantités importantes de virus sont libérées dans le sang. On note dans cette phase une chute du taux de CD4. Dans 50 % des cas, cette primo-infection est accompagnée de signes cliniques non spécifiques : fièvre, arthralgies, céphalées et polyadénopathies.

▪ Phase symptomatique (Stade ARC= Aids Related complex)

Elle commence avec l'apparition des anticorps anti-VIH dans la circulation, au plus tôt la 3^{ème} semaine et au plus tard le 7^{ème} mois après la contamination; le délai moyen d'apparition est de 6 à 8 semaines.

Immunophénotypage des lymphocytes T au cours de l'infection à VIH

Ces anticorps augmentent rapidement dans le sang alors que la virémie va chuter de façon très importante. Le virus ne se multiplie plus que dans les organes lymphoïdes et la virémie reste basse. Cette phase va durer en moyenne 8 ans. Cette multiplication virale est inhibée par l'action des lymphocytes T CD8+ (T-cytotoxique) qui détruisent les cellules infectées et par les anticorps qui vont limiter la fixation sur les cellules cibles.

▪ **Stade SIDA**

Lorsque le nombre de lymphocytes T CD4+ chute à moins de 200 cellules par mm³ de sang (la normale est de 1000/mm³), les défenses de l'organisme ne peuvent plus être assurées et la maladie commence. La virémie augmente de façon importante et devient facilement détectable, des infections opportunistes caractéristiques de l'immunodépression s'installent, on est alors au stade SIDA qui peut se traduire également par des manifestations nerveuses dues à l'atteinte du système nerveux central ou par un sarcome de Kaposi caractérisé par des lésions cutanées de couleur brun violet, infiltrées dans le derme.

2/Biologiques:

Les tests biologiques de détection du VIH sont de 2 types :

- Tests indirects, (ou sérologiques) visant à détecter dans le sang les anticorps produits par le système immunitaire contre les antigènes viraux.
- Tests directs de mise en évidence du virus (détection d'un composant du virus, comme l'antigène p24, ou de son génome par RT-PCR ,charge virale).

2.1/Test indirects:

-Dépistage

Le dépistage des anticorps anti-VIH (anti-VIH-1 et anti-VIH-2) s'effectue au moyen de tests de dépistage rapide (TDR) ou de tests dits « ELISA »

- Les TDR consistent à mettre en contact un échantillon de sang de la personne testée avec un support contenant des antigènes du virus ; si l'échantillon renferme des anticorps contre le VIH, il se produit une réaction antigènes-anticorps détectable à l'œil nu. les résultats sont qualitatifs, sous forme de réaction négative ou positive.**[Rapport synthétisé des notifications des cas de MST/SIDA,BCC/SIDA,RDC 2000]**

Immunophenotypage des lymphocytes T au cours de l'infection à VIH

- Les tests ELISA consistent à déposer sur une plaque recouverte de l'antigène du VIH le sérum de la personne à tester (Figure 4) puis à révéler à l'aide d'une réaction enzymatique [De Martino et al] la réaction antigène-anticorps se produisant en cas de présence d'anticorps anti-VIH dans l'échantillon, ces tests sont plus sensibles et plus spécifiques. [Rapport synthétisé des notifications des cas de MST/SIDA, BCC/SIDA, RDC 2000]

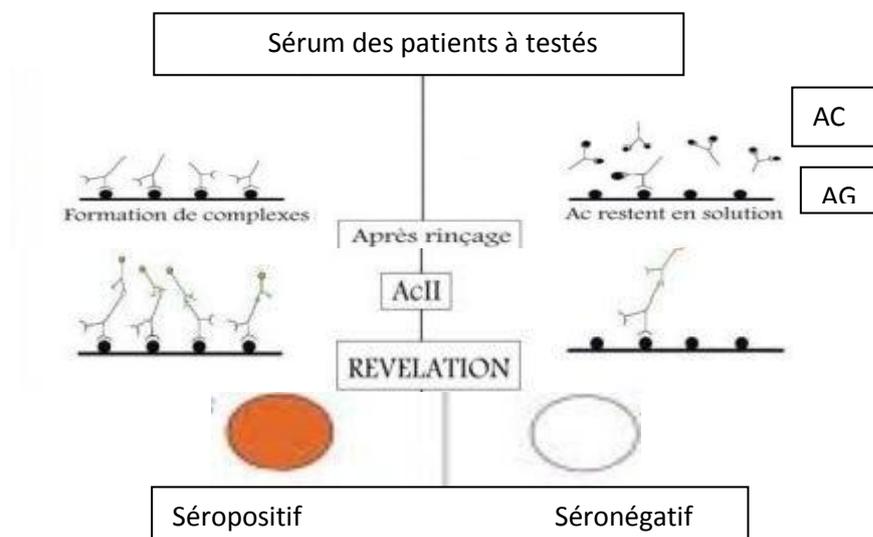


Figure4: Principe du dépistage sérologique du VIH par ELISA-Sandwich

-Tests de confirmation:

- La technique du Western Blot (WB) est la méthode de référence.
- Sur la bandelette de WB, différentes protéines constitutives du virus seront reconnues par des anticorps spécifiques anti-VIH-1 ou anti-VIH-2. Elles forment des bandes situées en des endroits particuliers de la bandelette, qui sont révélées par une réaction immuno-enzymatique
- le WB peut être difficile à interpréter quand il fournit un résultat « indéterminé », pouvant correspondre soit à une séroconversion récente, soit à une infection par un variant du VIH, soit à une réaction croisée avec un autre rétrovirus. [De Martino et al 1998]
- Technique des immunoblots: d'apparition plus récente et moins répandue. Elle fait appel aux mêmes principes que le WB mais utilise différentes protéines recombinantes ou de synthèse déposées sur des bandelettes de Nylon ou de nitrocellulose.

Immunophenotypage des lymphocytes T au cours de l'infection à VIH

2.2/Tests directs:

Tests de mise en évidence du virus:

Les tests de diagnostic direct de l'infection à VIH comportent la quantification virale, la culture virale et la recherche d'un constituant du virus, l'Ag p24.

- La quantification virale consiste à mesurer l'ARN du virus circulant dans le sang ou l'ADN du virus intégré dans ses cellules cibles, elle fait appel à une technique de biologie moléculaire d'amplification génique appelée RT-PCR, la quantité d'ARN viral correspond à la charge virale et constitue un critère de suivi important du traitement ARV, c'est la seule technique permettant de faire le diagnostic de l'infection à VIH chez les enfants exposés avant l'âge de 18 mois ou en cas de primo-infection avant que les anticorps ne soient détectables.
- La culture virale consiste à mettre en présence des lymphocytes du sujet infecté avec des lymphocytes d'un sujet non infecté, et à détecter les particules virales produites par les lymphocytes sains contaminés par les lymphocytes infectés, il s'agit d'une technique très coûteuse, longue (résultats obtenus dans un délai de 10 à 30 jours) et nécessitant une charge de travail importante, elle n'est jamais utilisée en pratique courante, car réservée à des laboratoires de recherche spécialisés, disposant en particulier de locaux conformes aux normes de sécurité imposées par ce type d'activités.
 - La recherche de l'Ag p24 fait appel à des tests ELISA « sandwich » dits tests combinés, capables de détecter l'Ag p24 en même temps que les anticorps anti-VIH, elle est intéressante pour diagnostiquer une infection à VIH au moment de la phase aiguë de primo-infection : en effet, à cette phase, l'Ag p24 peut être présent dans le sang en quantité élevée alors que les anticorps anti-VIH ne sont pas encore apparus.

4-Classification clinico-biologique selon le CDC (Center for Disease control,1993)

- **Stade A** Asymptomatique

Correspond à une primo-infection ou ployadenopathie

séropositivité aux anticorps du VIH en l'absence de symptômes [**Guide nationale de prise en charge des personnes vivant avec le VIH/SIDA- Cameroun.**]

- **Stade B** Symptomatique

Ce stade correspond aux stades II et III de la classification de l'OMS. Chez un patient infecté par le VIH, en la présence de manifestations cliniques ne faisant pas partie de la catégorie C et qui répondent

Immunophénotypage des lymphocytes T au cours de l'infection à VIH

au moins à l'une des conditions suivantes ; elles sont liées au VIH ou indicatrices d'un déficit immunitaire, elles ont une évolution clinique ou une prise en charge thérapeutique compliquée par l'infection à VIH [Guide nationale de prise en charge des personnes vivant avec le VIH/SIDA-Cameroun.]

- **Stade C SIDA**

Correspond à la définition du SIDA chez l'adulte. Cette phase est caractérisée par des infections opportunistes et certains cancers. Les critères cliniques sont les mêmes que le stade clinique IV de l'OMS [Guide nationale de prise en charge des personnes vivant avec le VIH/SIDA- Cameroun.

Rapport d'activité sur la riposte nationale au SIDA Algérie 2012].

- Pour chaque catégorie clinique, il existe trois niveaux en fonction du nombre de lymphocytes CD4 ou cellules T-helper qui sont la première cible du virus de l'immunodéficience humaine.

Nombre de lymphocytes CD4/mm ³	Stade clinique		
	A	B	C
Supérieur ou égal à 500	A1	B1	C1
Compris entre 200 et 499	A2	B2	C2
Inférieur à 200	A3	B3	C3

Tableau 2: Classification clinico-immunologique du sida (CDC 1993)

5-Cinétique de l'infection a VIH:

5.1-Etapes de l'infection a VIH:

- **Entrée du VIH dans les cellules immunitaires**

Le virus s'attache a une cellule cible qui porte a sa surface le récepteur CD4, liaison de la gp120 au CD4, puis la gp120 au corecepteur, qui peut être soit le CXCR4 soit le CCR5, par la suite on a la liaison gp41/membrane cellulaire (Fusion des deux membranes

- **Réplication du VIH dans les cellules immunitaires**

Le VIH est un rétrovirus, son matériel génétique a besoin d'intégrer le noyau de la cellule pour la détourner de son fonctionnement et assurer sa réplication (multiplication). Chaque étape est une cible potentielle pour des médicaments antiviraux.

Immunophenotypage des lymphocytes T au cours de l'infection à VIH

- Pénétration du virus dans la cellule hôte (Figure 6) Cette étape nécessite la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la cellule hôte. Ceci passe par la reconnaissance spécifique de la protéine d'enveloppe virale gp120 par le récepteur primaire CD4 de la cellule hôte, entraînant une modification conformationnelle de la gp120 capable alors de se fixer au corécepteur membranaire CXCR4 ou CCR5. Il s'ensuit un réarrangement de la protéine d'enveloppe virale gp41 qui permet la fusion des membranes virale et cellulaire, proprement dite.
- Rétrotranscription de l'ARN viral en ADN proviral, grâce à la transcriptase inverse qui est responsable d'erreurs fréquentes – 1 pour 10 000 copies de virus – à l'origine de la variabilité génétique du VIH.
- Intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte, grâce à l'intégrase virale.
- Production de nouvelles particules virales avec successivement :
 - Transcription de l'ADN pro-viral en ARN messager et en ARN génomique assurée par l'ARN polymérase de la cellule hôte.
 - Traduction des ARN messagers en protéines virales.
 - Clivage puis assemblage des protéines virales après intervention de la protéase virale.
 - Formation de nouvelles particules virales libérées dans le secteur extracellulaire par bourgeonnement, prêtes à aller infecter d'autres cellules. La réplication du virus est intense : environ 1 à 10 milliards de virions sont produits chaque jour par une personne infectée, non traitée

Immunophenotypage des lymphocytes T au cours de l'infection à VIH

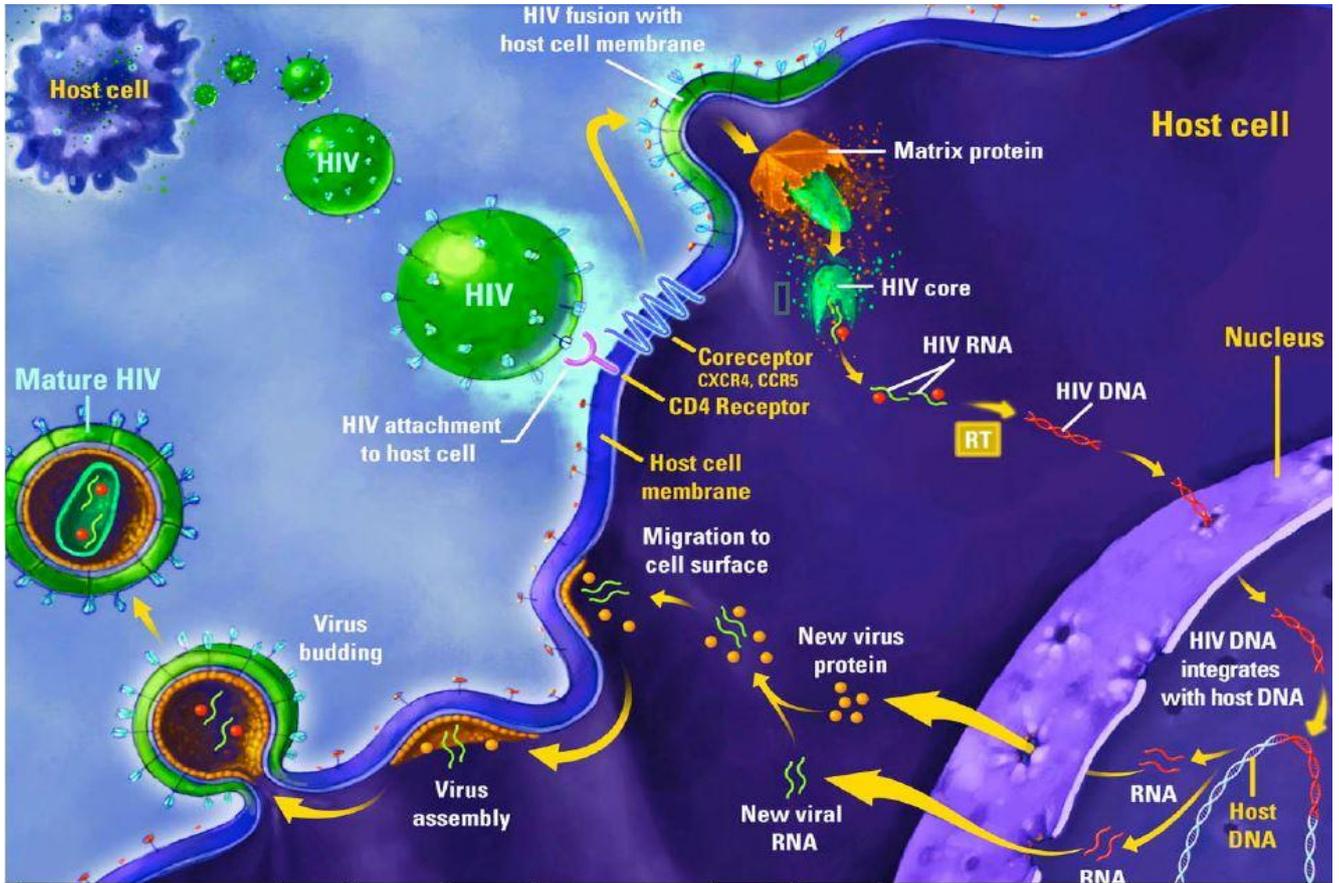


Figure 5: Etapes de l'infection à VIH

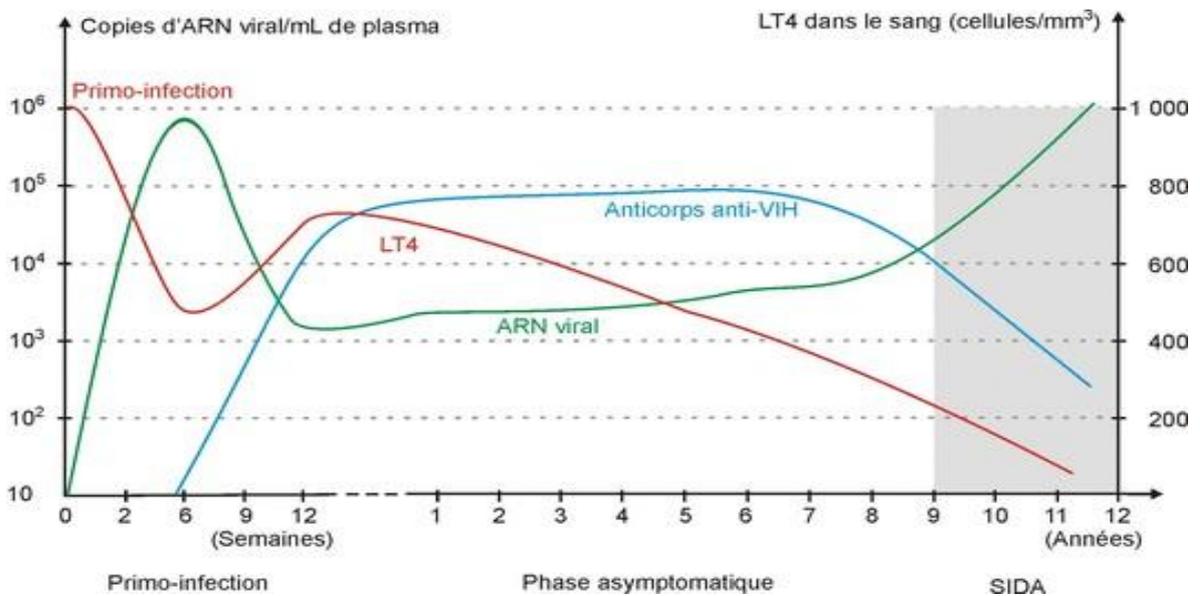


Figure 6: Cinétique de l'infection à VIH (Ac,LT,LB,ARN)

5.2-Marqueurs moléculaires (Charge virale):

Immunophénotypage des lymphocytes T au cours de l'infection à VIH

La charge virale mesurée au niveau du plasma permet de quantifier l'ARN viral après amplification par la technique de RT-PCR. C'est cette mesure qu'on utilise maintenant en pratique courante et que l'on appelle "charge virale", elle est indétectable jusqu'à dix jours après l'infection "Phase éclipse" (Figure 7) après quoi une importante virémie est observée [Adrian B et al 2012].

Hormis son intérêt pour évaluer l'effet des thérapeutiques, elle permettrait d'apprécier des risques évolutifs (évolution rapide en cas de valeur élevée au cours de la première année qui suit la découverte de la séropositivité), des risques de transmission materno-fœtale plus élevés en cas de charge virale élevée chez la mère. Des valeurs plutôt basses (inférieures à 10 000 copies/ml) seraient fréquentes chez les « non-progresseurs » à niveau de LTCD4 stable, ces patients sont connues sous le nom de « Elite controllers » quelques uns de ces patients sont infectés avec des versions défectueuses du virus [Adrian B et al 2012]

La charge virale est le plus souvent exprimée en copies/ml. La mesure de la charge virale est un examen important. La variation est significative si la charge virale a été multipliée ou divisée par plus d'un facteur trois.

Dans certains cas, on peut dire CV basse pour des chiffres inférieurs à 10 000, élevée pour des chiffres de plus de 100 000.

6-Phénotype lymphocytaire T CD4 et infection à VIH:

La diminution progressive des LT CD4+ dans le sang périphérique est l'un des marqueurs les plus importants dans le suivi de l'infection chez les sujets infectés par le VIH-1.

A côté, l'infection induit une activation des cellules T, qui se traduit par la surexpression des marqueurs phénotypiques d'activation : le CD38 et la molécule HLA-DR [L.Kestens et al 1995]. Des études ont montré que l'expression relative de CD38 et de HLA-DR par les LTCD4+ augmente chez les sujets VIH et devient relativement plus importante avec la progression de l'infection de la phase asymptomatique vers la phase symptomatique [Zhang Z et al.Savariona a et al.M.Almeida et al 2011]. Les sujets des stades II, III et IV (selon l'OMS) ont une plus grande proportion de LTCD4+ CD38+ HLA-DR+ que les sujets du stade I [M.Almeida et al 2007]. La baisse du pourcentage de LTCD4+ CD38+ HLA-DR+ utilisée comme facteurs pronostique cellulaires a été observée chez les sujets non-progresseurs à long terme comparé aux progresseurs asymptomatiques [Decreased expression of activation markers on CD4 T lymphocytes o HIV infected long-term non-progressors]

Immunophenotypage des lymphocytes T au cours de l'infection à VIH

La charge virale augmente progressivement du stade I aux stades suivants, ceci est suivi par une baisse des lymphocytes totaux, du pourcentage de LTCD4+ et du nombre absolu de LTCD4+. De la même manière, il existe une corrélation positive entre la présence de l'antigénémie p24 et l'activation des lymphocytes T et de facto la surexpression de CD38, HLA-DR [L.Kestens et al 1995]. Cette augmentation indique une progression de l'infection et reflète un état d'activation immunitaire chronique.

Sur le plan thérapeutique, il existe une corrélation positive entre l'expression de CD38 par les LTCD4+ et la charge virale chez les patients non traités avec un taux de LTCD4+ supérieur à 200/mm³. En effet après 8 semaines de traitement la charge virale devient indétectable chez les patients avec un taux de CD4+ supérieur à 200/mm³ et après 12 semaines elle devient indétectable à tous les stades de la l'infection il en est de même pour le HLA DR.

Ainsi, la surexpression de CD38 par les LTCD4+ dès l'instauration d'une thérapie antirétrovirale est un indicateur d'un bon pronostic. La diminution concomitante de la charge virale et de CD38 et HLA DR après traitement serait de bon pronostic.

En pédiatrie, les enfants VIH ont un nombre absolu de LTCD4+ un pourcentage de LTCD4+ CD38+ directement corrélié. Des manifestations sévères et une détérioration immunologique ont été observées chez les enfants avec des pourcentages de LTCD4+ CD38+ bas, alors que de lourdes aggravations virologiques ont été associées à un bas pourcentage de LTCD8+ CD38+ et LTCD8+ HLA-DR+. La charge virale été inversement proportionnelle aux pourcentages de LTCD4+ CD38+, LTCD4+ HLA-DR+, ceci signifie que l'expression de la molécule CD38 par les LTCD4+ est un marqueur favorable chez les enfants VIH+ [De Martino et al 1998].

II. Matériel et Méthodes:

Sur une période de six mois, trente patients infectés par le VIH ont été recrutés au niveau du service de maladie infectieuse de l'Hôpital Central de l'Armée. L'infection a été diagnostiquée par des tests ELISA et confirmée par un Westernblot. Des kits ELISA (BioRad) ont été utilisés pour le dépistage des patients, dont les caractéristiques ont été recueillies grâce à une fiche clinico-biologique.

1-Matériel biologique :

Sang

2-Matériel non-biologique :

2.1 Technique ELISA:

Voir Annexe1

2.2 Cytométrie :

voir Annexe2

3-Méthodes:

3.1 Technique ELISA:

-Prélèvement:

Sérum non hémolysé, ou plasma hépariné. Recueilli après centrifugation, les échantillons peuvent être conservés durant 7 jours entre 2-8°C et 3 mois à -20°C. Des antigènes viraux (protéines d'enveloppe et de capsid) sont fixés au fond d'une petite cupule. On ajoute le sérum à tester : s'il contient des anticorps spécifiques, ils sont "capturés" par les antigènes. On révèle la fixation des anticorps spécifiques du virus en ajoutant un anticorps anti-Ig humain. On ajoute le substrat de l'enzyme : l'hydrolyse du substrat par l'enzyme génère une coloration dont on apprécie l'intensité. On pratique en même temps une réaction avec des sérums "témoins" positifs et négatifs

-Principe:

Le principe de ce test est basé sur le principe d'ELISA sandwich, la réaction Ag Ac se révèle par un anticorps monoclonal. La lecture se fait par un spectrophotomètre.

-Protocole:

Puits coatés par des Ag

- Déposer 100µl de sérum dans les puits
- Incubation 30min à température ambiante
- Lavage (Automate)
- Déposer 50µl de conjugué dans chaque puits

Immunophénotypage des lymphocytes T au cours de l'infection à VIH

- Incubation 30min à température ambiante
- Lavage
- Rajouter 50µl de substrats A et B (Substrats chromogènes)
- Incubation 15min à température ambiante
- Lecture au spectrophotomètre
- Contrôle de qualité et calcul de la valeur seuil

3.2 Cytométrie:

3.2.1.Principe:

La cytométrie en flux ou CMF est une technologie qui permet l'analyse simultanée qualitative et quantitative de multiples paramètres cellulaires dans une population hétérogène en suspension. Les cytomètres en flux sont utilisés dans un grand nombre d'applications comme l'immunophénotypage, et l'analyse du cycle cellulaire.

Les données sur la cellule recueillies par le cytomètre en flux sont la taille relative de la cellule, sa granulosité et enfin son intensité relative de fluorescence selon l'Ac fluorescent utilisé.[2,33] Ce procédé d'analyse cellule par cellule est multiparamétrique et peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde. L'ordinateur calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres mesurés et les représente sous la forme d'histogrammes (1 paramètre) ou de cytogrammes (2paramètres) sur une ou plusieurs populations dont les propriétés cellulaires sont ainsi évaluées. La CMF est née du besoin d'automatisation du comptage des constituants cellulaires du sang

-Prélèvement:

05 ml de sang total ont été prélevés pour chaque patient, sur tube anticoagulant EDTA et sont accompagnés d'une fiche clinique détaillée. Les patients sont sous traitement antirétroviral; 6 trithérapies spécifique pour chaque patient.

- Protocole

100µl de sang total sont transférés dans un tube à fond rond de 5ml à l'aide d'une micropipette.

- Rajouter 10µl d'anticorps (Mélange anti-CD3 FITC,anti-CD4 PE, anti CD38 PerCP et anti HLA-DR APC)
- Vortexer immédiatement
- Incuber pendant 15 à 30min à température ambiante et à l'abri de la lumière
- Lyse des erythrocytes en rajoutant une solution de lyse diluée ,(1ml de solution pure,BD FACS Lysing solution + 9ml d'eau distillée)

Immunophenotypage des lymphocytes T au cours de l'infection à VIH

- Vortexer
- Incuber pendant 10min à température ambiante et à l'abri de la lumière
- Centrifuger à 1500 t/min pendant 5min
- Retirer le surnageant
- Rajouter 2 à 3ml de CellWash (solution de lavage)
- Centrifuger à 1500 t/min pendant 5min
- Rajouter 500µl de BD Facsflow (Re-suspension des cellules pour la lecture)
- Lecture au Cytomètre

Les lymphocytes vont être identifiés et contrôlés suivant des paramètres "Taille Vs Structure" (FSC/SSC). Énumération des LTCD4+ par le Cytomètre à quatre couleurs, grâce aux anticorps spécifiques pour les CD3, CD4, CD38 et HLA-DR.

III. Résultats:

1-Caractéristiques démographiques et clinique des patients:

Le sexe ratio, l'âge moyen, et le nombre de patients par stade sont présentés dans le "Tableau 3"

Caractéristiques	N=30
Moyenne d'âge	38
Hommes	26
Femmes	4
Sexe ratio M/F	6,5 (26-4)
Stade	A n= 7
	B n=15
	C n=8
Durée du suivi	6 mois

Tableau 4: Caractéristiques démographiques et cliniques de la population étudiée

2-Résultats du diagnostic virologique:

Après le calcul de la densité optique, et l'interprétation des données par rapport à la valeur seuil, les résultats de l'ELISA se sont tous révélés au dessus de la valeur seuil, ces résultats ont été confirmés par un Westernblot, et donc les 30 patients sont séropositifs au VIH.

3-Résultats de l'immunophénotypage lymphocytaire TCD4+ CD38+ HLA-DR+ :

- On a observé chez 25 patients sur 30; une relation entre la charge virale et le pourcentage de lymphocytes T CD4+ activés, ainsi l'expression des marqueurs d'activation, CD38 et HLA-DR, baisse à mesure que la charge virale diminue.
- Chez 3 patients sur 30; on a observé une augmentation du pourcentage de LTCD4+ et une baisse du pourcentage de LTCD4+ HLA-DR+ et LT CD4+ CD38+ malgré une charge virale qui augmente.
- Chez 2 patients sur 30; la charge virale diminue, le pourcentage de LTCD4+ et LTCD4+ CD38+ baisse, celui des LT CD4+ HLA-DR+ augmente

Immunophénotypage des lymphocytes T au cours de l'infection à VIH

La moyenne des LTCD4⁺ est très élevée pour le stade B: 8,53% comparée aux deux autres stades (A: 4,42 % et C: 3,25%) elle est intermédiaire pour le stade A et plus basse pour le stade C (Figure 7)

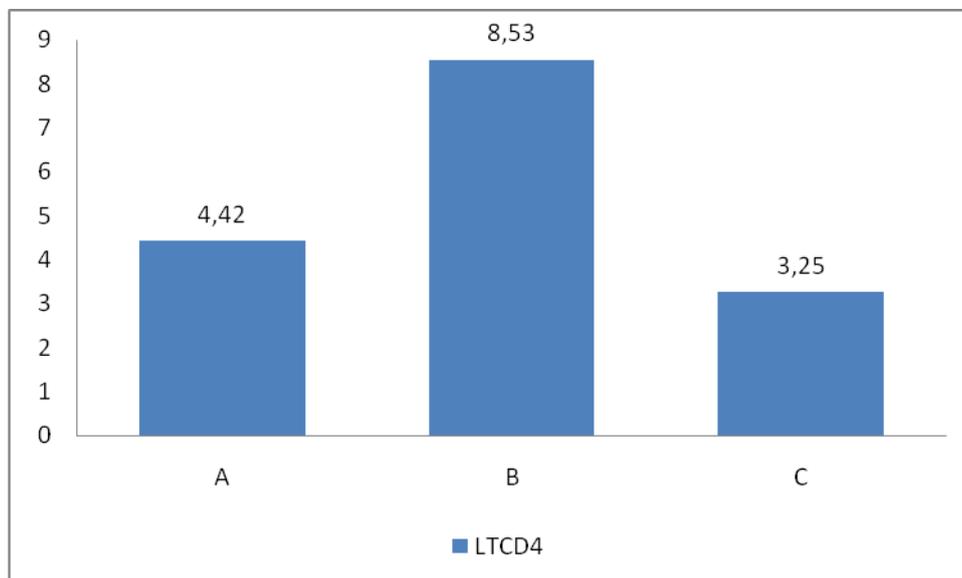


Figure7: Moyenne des LTCD4 en fonction du stade de la maladie

La moyenne des LTCD4 HLA-DR⁺ et LTCD4 CD38⁺ est relativement identique pour les stades A et B ,alors qu'elle est un peu plus basse pour le stade C (Figure 8)

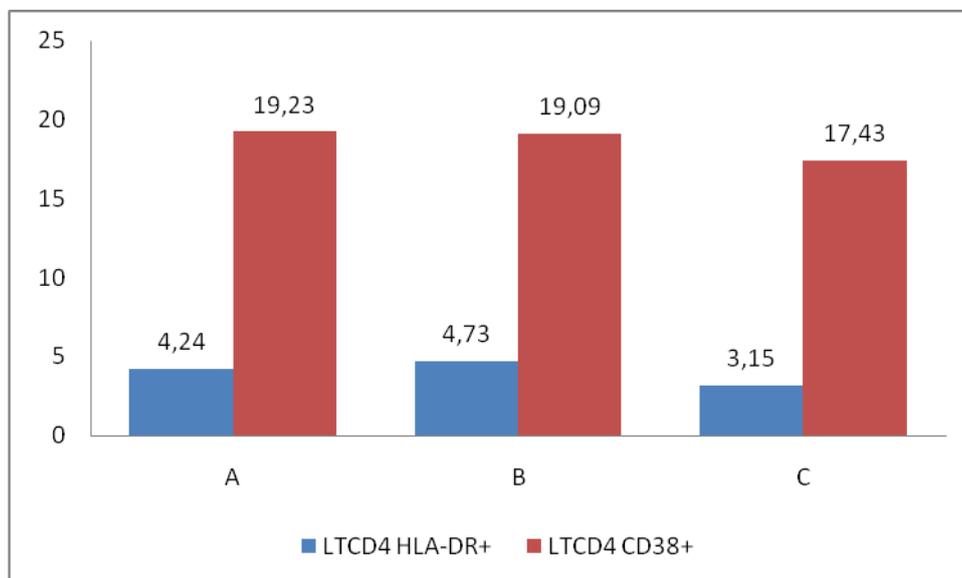


Figure8: Moyenne des LTCD4 HLA-DR⁺ et LTCD4 CD38⁺ en fonction du stade de la maladie

La moyenne des LTCD4 CD38⁺ est élevée pour le stade A:19,23% elle baisse ensuite ,légèrement pour le stade B:19,09% Le CD38 est très peu exprimé par les LTCD4,chez les patients au stade C:17,43% en comparaison avec les deux stades précédents. (Figure9)

Immunophénotypage des lymphocytes T au cours de l'infection à VIH

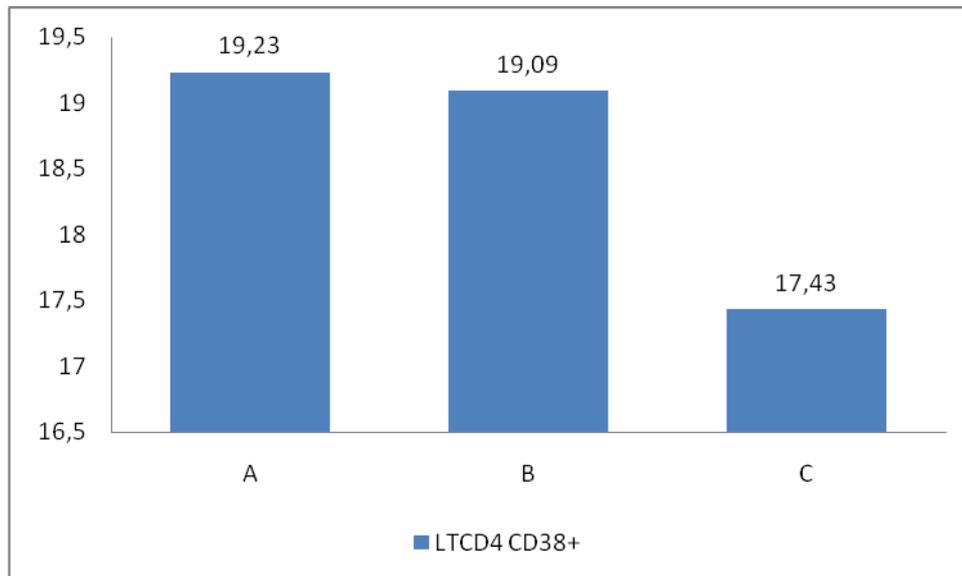


Figure9: Répartition du pourcentage de LTCD4 CD38+ en fonction du stade de la maladie

La moyenne des LTCD4 HLA-DR est sensiblement plus élevée pour le stade B:4,73% par rapport au stade A:4,24% et elle est plus basse pour le stade C:3,15% .(Figure10)

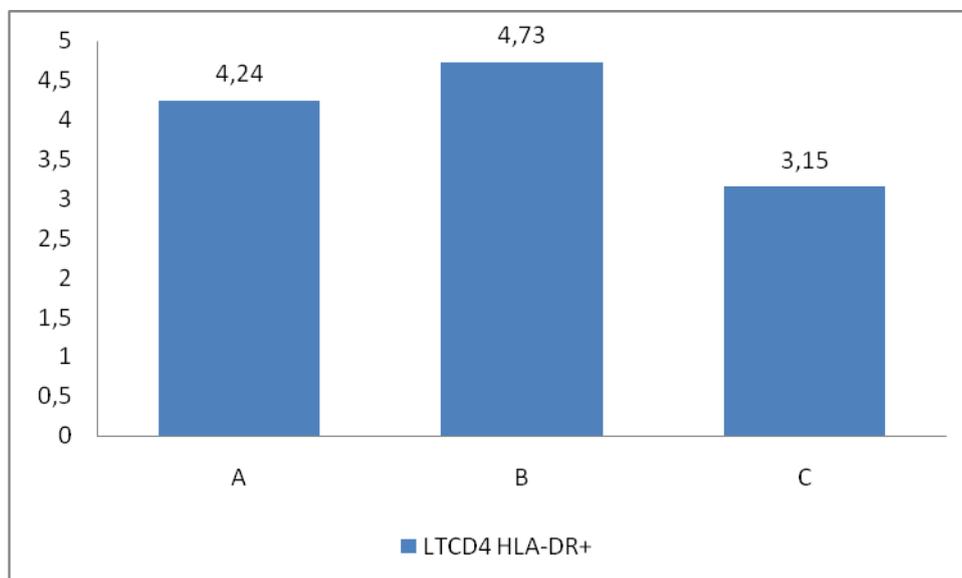


Figure10: Répartition du pourcentage de LTCD4 HLA-DR+ en fonction du stade de la maladie

La moyenne des LTCD4 est plus élevée pour les patients dont l'âge est compris entre 0-30 ans, elle est à 5,85% elle baisse progressivement pour les patients compris entre 30-50 ans ,elle est à 5,36% et > 50ans elle est à 3,99%

Immunophénotypage des lymphocytes T au cours de l'infection à VIH

La moyenne des LTCD4 HLA-DR+ est plus élevée pour les patients dont l'âge est compris entre 0-30ans elle est à 4,94% ,comparée aux patients de 30-50ans pour qui elle est à 4,36% et c >50 ans à 3,74%

La moyenne des LTCD4 CD38+ est plu élevée pour les patients dont l'âge est compris entre 0-30ans, elle est à 24,52% comparée aux patients de 30-50ans, elle est à 18,54% et >50ans ,à 17,42%

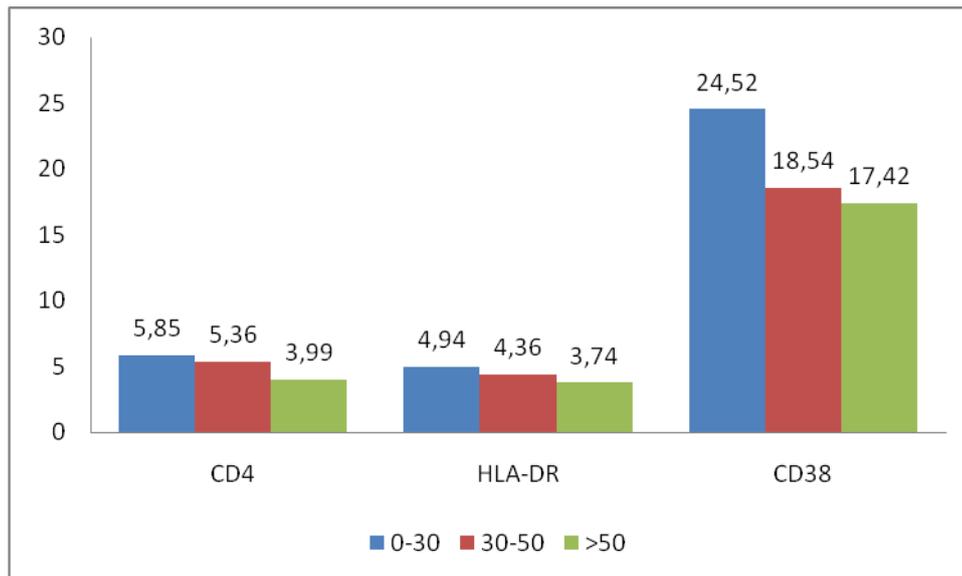


Figure11: Moyenne des LTCD4,LTCD4 HLA-DR+ et LTCD4 CD38+ en fonction de l'âge des patients

Le taux de LTCD4+ augmente en fonction du temps, il passe de 0,02% à 0,46 % (Figure 12)

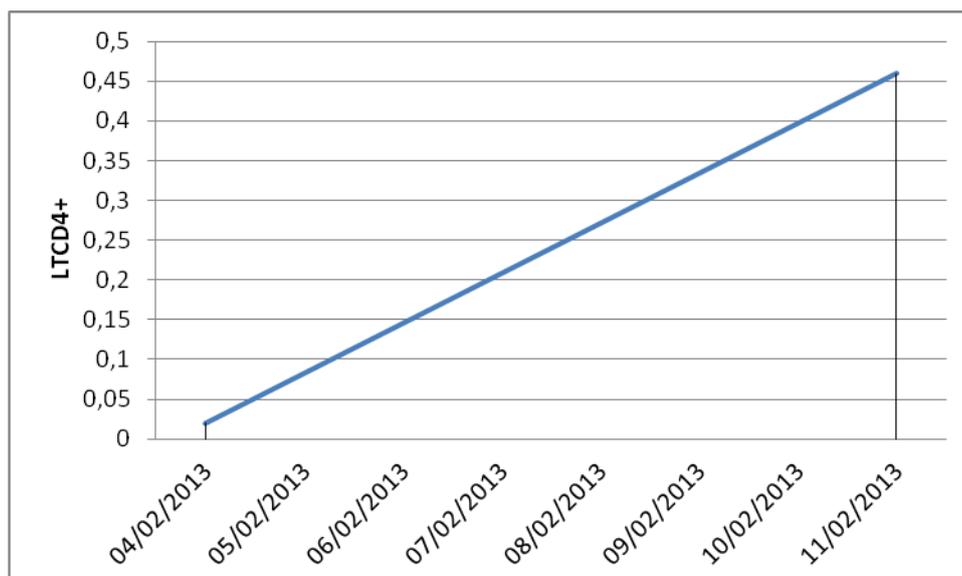


Figure12: Evolution du taux de LTCD4 en fonction du temps pour le patient 1

Le taux de LTCD4+ baisse en fonction du temps, il passe de 0,46 à 0,31 (Figure13,14,15)

Immunophenotypage des lymphocytes T au cours de l'infection à VIH

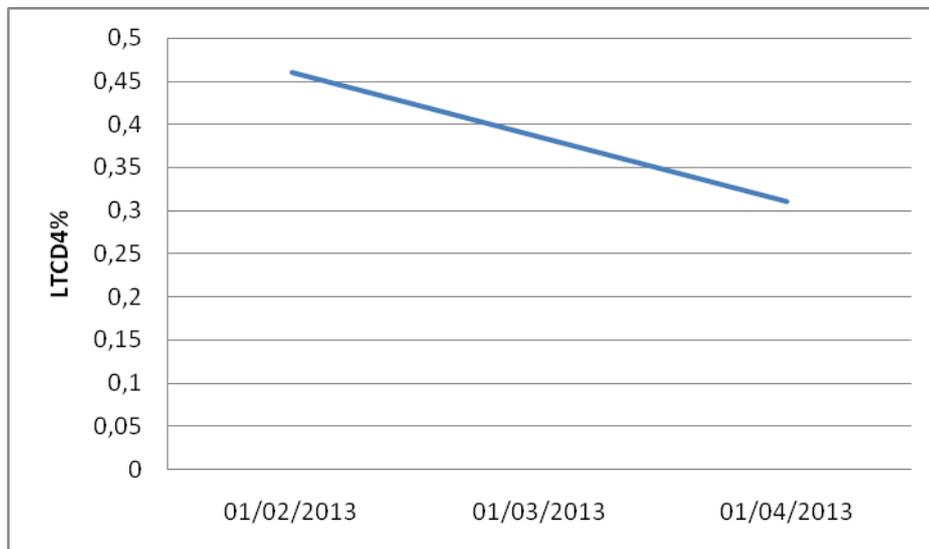


Figure13: Evolution du taux de LTCD4 en fonction du temps pour le patient 2

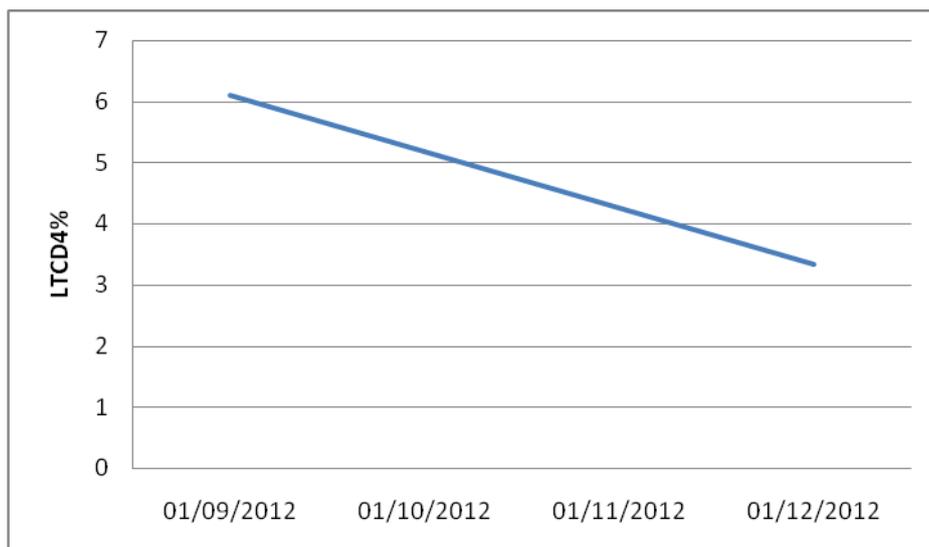
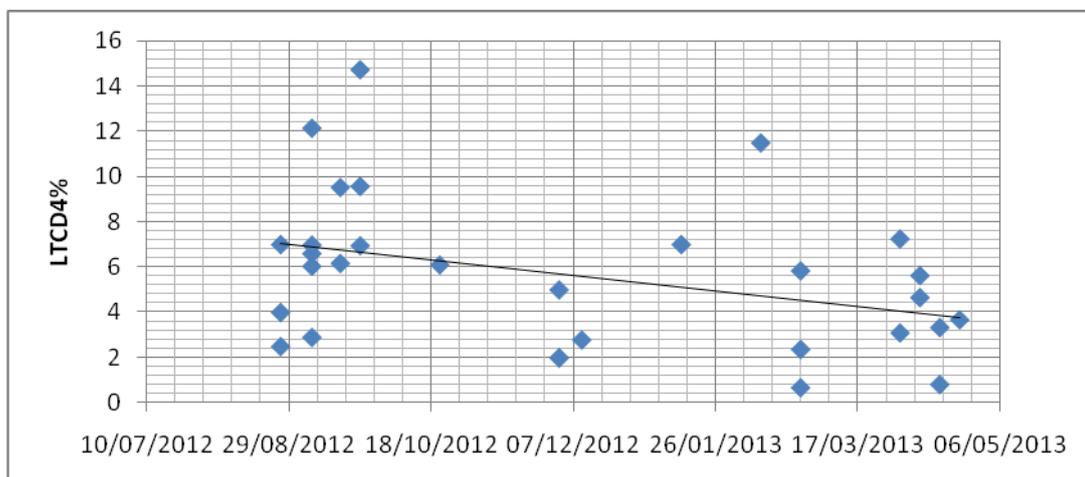


Figure14: Evolution du taux de LTCD4 en fonction du temps pour le patient 4



Immunophenotypage des lymphocytes T au cours de l'infection à VIH

Figure15: Evolution du taux de LTCD4 en fonction du temps pour 25 patients

Le taux de LTCD4+ baisse à mesure que la charge virale baisse, on observe donc une forte relation entre l'évolution du taux de LTCD4+ et la charge virale.(Figure16,17, et 18)

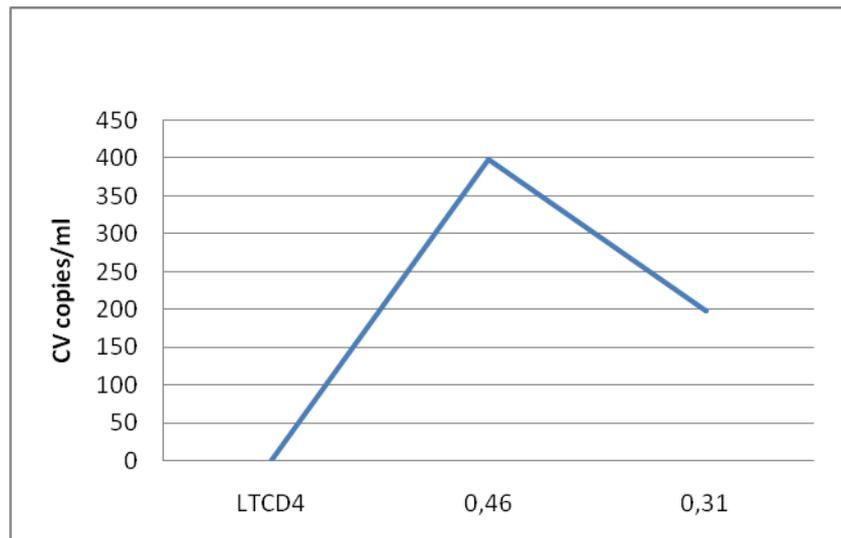


Figure16: Evolution du taux de LTCD4 en fonction de la charge virale pour le patient 1

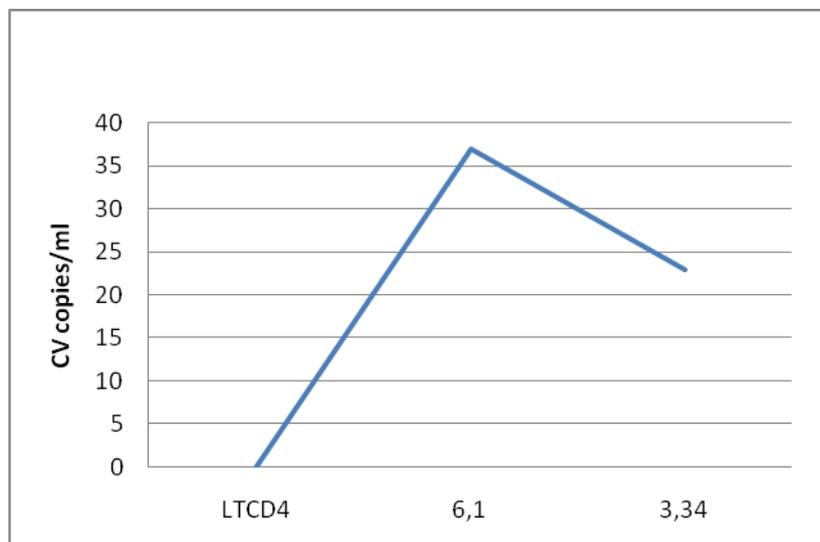


Figure17: Evolution du taux de LTCD4 en fonction de la charge virale pour le patient 6

Immunophenotypage des lymphocytes T au cours de l'infection à VIH

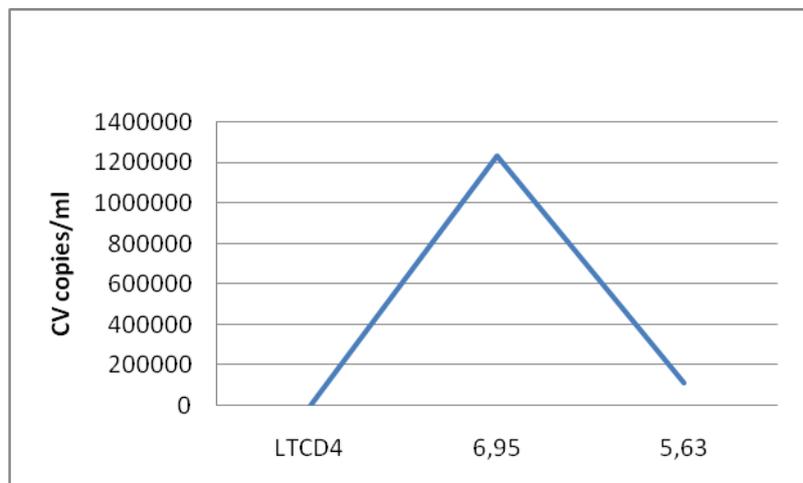


Figure18: Evolution du taux de LTCD4 en fonction de la charge virale pour le patient 17

La charge virale diminue en fonction du temps pour les patients qui ont un taux de LTCD4+ descendant.

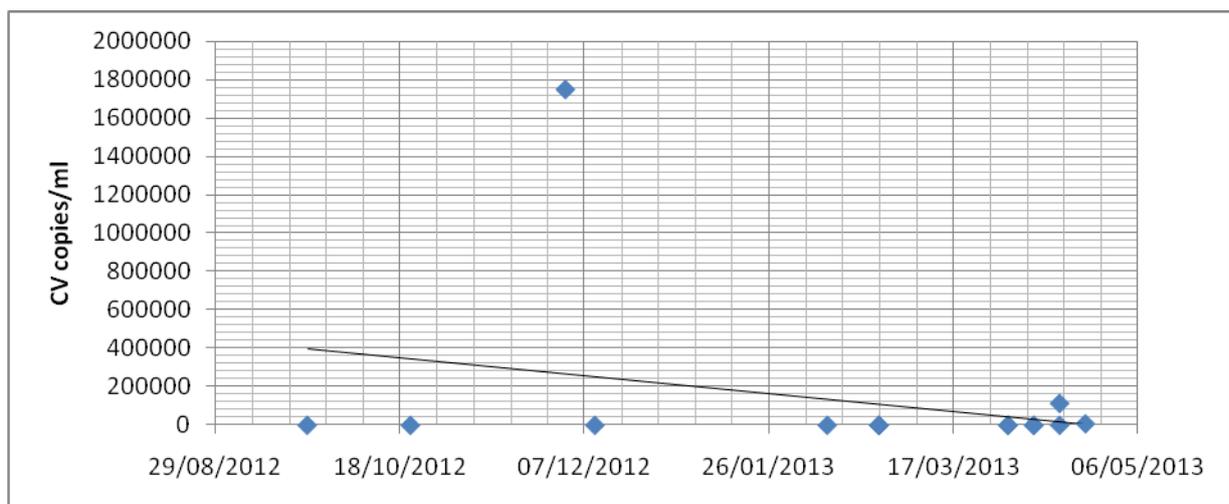


Figure19: Evolution de la charge virale en fonction du temps pour tous les patient

La moyenne de LTCD4+ pour les patients dont la charge virale est <40 copies/ml est de 3,93% ,pour les patients dont la charge virale est comprise entre 40-120 copies/ml elle est de 2,04% et pour les patients dont la charge virale est >120 copies/ml elle est de 4,43% .La moyenne est donc relativement basse pour une charge virale comprise entre 40-120 copies/ml. Elle est un peu plus importante pour une charge virale <40 copies/ml et >120 copies/ml.

IV. Discussion:

Plusieurs études ont pour objet la détermination des marqueurs pronostique et de suivi chez les patients séropositifs ou en stade SIDA. Mis à part les éléments sérologiques comme l'antigénémie p24 et la charge virale, la cellularité T CD4 s'avère comme un élément central dans le suivi de ces patients et le monitoring thérapeutique.

L'infection VIH a pour effet une activation lymphocytaire T avec apparition des marqueurs d'activation tel que CD38 et HLA DR, notre étude s'est attelé à mesurer ces marqueurs et à les comparer aux différents indicateurs cliniques et biologiques de progression de la maladie. L'hypothèse de départ était la mise en évidence d'une relation entre le taux de LT CD4+ CD38+ HLA DR+ et le taux de la charge virale, le stade ainsi que la réponse aux traitements antirétroviraux.

Chez plus de 83% de nos patients (25/30) une augmentation relative de l'expression de CD38 et HLA-DR par les LTCD4+ a été notée, rejoignant ainsi les résultats de *Kestens et al 1995* *Peter Hunt et al 2011* et *Smith et al 2013* Sur les 5 patients restants, 2 sujets (6.6%) ont montré une augmentation de l'expression d'HLA-DR et une baisse de l'expression de CD38, ceci correspond aux résultats obtenus, par l'équipe de *Kestens et al 1995* et 3 montrent une diminution simultanée du CD38 et de HLA DR.

	%CD4+ HLA-DR+		%CD4+ CD38+		%HLA-DR+ CD38+	
	T	P	T	P	T	P
<i>L.Kestens et al</i>	10,4%	25%	59%	70%	2,3%	
<i>Smith et al</i>	----	----	----	----	0,42%	2,98%
Présente étude	----	4,38%	----	18,30%	----	----

Tableau 4: Comparaison entre les différentes études faites antérieurement et nos résultats.

Par ailleurs nous avons confirmé la relation entre la charge virale et l'activation des LTCD4+. Plus la charge virale augmente plus le taux de LTCD4+ activés augmente et inversement, ceci rejoint les résultats de *Kestens et al 1995* Cette même équipe a démontré que les patients avec un niveau

Immunophénotypage des lymphocytes T au cours de l'infection à VIH

déTECTABLE d'antigène dans le sang avaient un pourcentage moins élevé de LTCD4+ comparés aux patients VIH dont la charge virale était indéTECTABLE, ceci n'a pas été étudié dans notre travail.

Les patients du stade A ont montré une moyenne de LTCD4+ activés de 4,42% cette moyenne est moins importante par rapport aux patients du stade B pour qui elle est de 8,53% et légèrement plus importante que pour le stade C dont la moyenne est de 3,25%, ceci ne correspond pas aux résultats de *Kestens et al 1995* et de *Hunt et al 2011* qui ont montré une augmentation importante du stade A aux stades suivants.

L'expression de HLA-DR augmente légèrement du stade A au stade B, elle passe d'une moyenne de 4,24% à 4,73% ceci est en accord avec les résultats obtenus par *L.Kestens et al 1995* *Peter Hunt et al 2011* et *Smith et al 2013*, elle baisse ensuite pour le stade C, elle passe à 3,15% alors qu'elle est sensée augmenter du stade A aux stades suivants, d'après les résultats de *Kestens et al 1995* et *Hunt et al 2011* L'expression de CD38 diminue du stade A aux stades suivants, alors que d'après l'étude de *Kestens et al 1995*, elle devrait demeurer inchangée à tous les stades de l'infection.

Par ailleurs, on a observé une relation entre la charge virale et le taux de LTCD4+ activés, plus la charge virale baisse plus le taux de LTCD4+ activés diminue.

Notre étude montre que la proportion de LTCD4+ exprimant le CD38 et HLA-DR est augmentée chez les patients VIH, et que l'expression relative des deux marqueurs est plus élevée chez les patients symptomatiques et SIDA que chez les patients asymptomatiques.

L'expression de CD38 et HLA-DR augmente avec la progression de l'infection (pour les deux premiers stades) *L.Kestens et al 1995*. Les deux marqueurs d'activation des LTCD4 ; HLA-DR et CD38 sont par conséquent, des éléments importants dans la surveillance de l'évolution de l'infection. D'après les résultats obtenus, il est plus précis de comparer la variation du taux de CD4 HLA-DR et CD4 CD38 plutôt que la variation du taux de LTCD4.

V. Conclusion:

L'infection à VIH est jusqu'à présent la pathologie infectieuse la plus grave en termes d'épidémiologie et de prise en charge. La caractérisation de l'agent infectieux ne suffit pas à elle seule pour comprendre le mode d'action du virus, la compréhension passe par la mise en évidence des mécanismes de défense immunologique impliqués et ce, en terme de qualité (LT, LB, NK, PNN), de quantité d'effecteurs (% des sous populations) mais aussi en terme de marqueurs d'activation immunitaire.

Les données présentées dans ce travail caractérisent la nature des LTCD4+ activés au cours de l'infection VIH dans une petite cohorte de patients Algérien. Elles démontrent que l'activation des LTCD4+ est associée à une déplétion en LTCD4+ et ce, malgré une charge virale indétectable, et que les sujets « VIH résistants » ont des niveaux élevés de lymphocytes T activés.

Ces résultats montrent une répartition disparate d'activation immune dans les populations de lymphocytes TCD4+ en fonction de leur spécificité et suggèrent que le niveau élevé de l'activation immunitaire qui caractérise l'infection chronique par le VIH peut être influencé par la persistance d'antigènes.

Les résultats restent peu significatifs en raison du nombre réduit de patients, il serait plus intéressant, dans une étude ultérieure, d'élargir la cohorte, et d'exploiter d'autres paramètres, tels que le taux des autres sous population lymphocytaires (NK, NKT, LT régulateurs,...) ainsi que l'étude croisée avec le traitement suivi.

VI. Bibliographie:

- Adrian B. McDermott, Richard A. Koup.2012. CD8 T cells in preventing HIV infection and disease. *AIDS*, 26:1281–129

- Alvarez M, Chueca N, Guillot V, Bernal M and García F. 2012. Improving Clinical Laboratory Efficiency: Introduction of Systems for the Diagnosis and Monitoring of HIV Infection. *Virology Journal*, 6, (Suppl 1: M5) 135-143)

- Amie L. Meditz, Michelle K. Haas, Joy M. Folkvord, Kelsey Melander, Russ Young, Martin McCarter, Samantha MaWhinney, Thomas B. Campbell, Yolanda Lie, Eoin Coakley, David N. Levy, and Elizabeth Connick. 2011. HLA-DR+ CD38+ CD4+ T lymphocytes have elevated CCR5 expression and produce the majority of R5-tropic HIV-1 RNA in vivo. *Journal of virology*, p.10189-10200 (Vol.85, No.19)

- Brenchley, J *Exp Med* 2004, Mehandru, J *Exp Med* 2004, Guadalupe, J *Virol* 2003 pages 1183–1192, *Cellular Microbiology* (8), 1183–1192

- Coetzee LM, Tay SS, Lawrie D, Janossy G, Glencross DK. 2009. From research tool to routine test. CD38 monitoring in HIV patients. *Cytometry Part B* 76B: 375–384)

- Decreased expression of activation markers on CD4 T lymphocytes of HIV-infected long-term non-progressors. *AIDS* 2003, 17:133-143

- De Martino M, Rossi ME, Azzari C, Gelli MG, Galli L, Vierucci A. 1998. Different meaning of CD38 molecule expression on CD4+ and CD8+ Cells of children perinatally infected with human immunodeficiency virus type 1 infection surviving longer than five years. *Jun*;43(6):752-8.

- Gallo RC, Montagnier L. 2002. Historical essay. Prospects for the future. *Science*, 298:1730-173

- Gallo RC, Historical essay. 2002. The early years of HIV/AIDS. *Science*, 298:1728-1730

Immunophenotypage des lymphocytes T au cours de l'infection à VIH

- Guide national de prise en charge des personnes vivant avec le VIH/SIDA - Cameroun
- Johan Klasse 2012. The molecular basis of HIV entry. *Microbiology*. Volume 14, Issue 8
- L.Kestens,G.Vanham, C.Vereecken,M.Vandenebruaene,G.Vercauterene,R.L. Colebunders & P. L. Gigash,1994, Selective increase of activation antigens HLA-DR and CD38 on CD4+CD45RO+ T lymphocytes during HIV-1 infection. *Clin Exp Immunol*; 95:436-441
- Levy JA. 1993. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Rev* 57:183-289
- Mariani et al. 2010,Asymmetric HIV-1 co-receptor use and replication in CD4+ T lymphocytes *Journal of Translational Medicine* ,9(Suppl 1):S8
- Modélisation de l'infection par le VIH, identification et aide au diagnostic,2006,Écol Doctorale Sciences et Technologies De l'Information et des Matériaux, Université de Nantes
- M.Almeida,M.Cordero,J.Almeida, and A.Orfao.2007. Relationship Between CD38 Expression on Peripheral Blood T-Cells and Monocytes, and Response to Antiretroviral Therapy: A One-Year Longitudinal Study of a Cohort of Chronically Infected ART-Naive HIV-1 Patients. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 72B:22–33
- Patrick Autissier,2010 Conservatoire nationale des arts et métiers.
- RAGUIN, ROZENBAUM W, 1987 *Le SIDA* édition Afrique noire, francophone, p4-47
- Rapport d'activité sur la riposte nationale au SIDA Algérie 2012(suivi de progrès sur la déclaration politique sur le VIH/SIDA 2011)
- Rapport du PNLS, République Démocratique du Congo 2003, Page 2
- Rapport ONUSIDA sur l'épidémie mondiale de sida | 2012 « ONUSIDA / JC2417F
- Rapport synthétisé des notifications des cas des MST/SIDA, BCC/SIDA, RDC 2000, p1-8

Immunophenotypage des lymphocytes T au cours de l'infection à VIH

- Relationship between T Cell activation and CD4+ T Cell count in HIV-Seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. *The journal of infectious diseases* 2008;197:126-33

-Savarino A, Bottarel B, Malavasi F and Dianzani U, 2000, Role of CD38 in HIV-1 infection: an epiphenomenon of T-cell activation or an active player in virus/host interactions, *AIDS*, 14:1079-108)

-Smith et al - Impact of antigen specificity on CD4+ T cell activation in chronic HIV-1 infection. 2013. *BMC infectious diseases*, 13:100

-Tuillon E, Al Tabaa Y, Baillat V, Segondy M, Picot M, Reynes J, and Vendrell JP 1,5. 2009. Close Association of CD81/CD38^{bright} with HIV-1 Replication and Complex Relationship with CD4⁺ T-Cell Count. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 76B:249–260

-Zhang Z, Hu S, Liu J, Xu J, He L, Jiang Y, Wang Y, and Shang H. 2011. CD4⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺ Cells: a Predictor of Viral Set Point in Chinese Men with Primary HIV Infection Who Have Sex with Men. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 64, 423-425

Immunophenotypage des lymphocytes T au cours de l'infection à VIH

Annexes:

Annexe1:

-Verrerie :

- Eprouvette gradué de 1000 cc de capacité.
- Verre a pied.

-Consommable :

- Plaque cupule spécifique a HIV.
- Pipettes et micropipettes fixes et variables.(25 μ l,75 μ l,80 μ l et 100 μ l)
- Embouts pour les pipettes.
- Tubes de prélèvements.
- Portoirs pour les tubes.
- Eau distillé.
- Papier absorbant.
- Pissette d'alcool chirurgical.
- L'eau de javel pour la désinfection.

-Appareillage

- Lecteur ELISA.
- Laveur automatique.
- Incubateur.
- Centrifugeuse.
- Agitateur de plaque

-Réactifs :

- Solution de lavage concentrée ($\times 20$).
- Conjugués
- Substrat A et B (Chromogènes)
- Solution de stoppage : Solution d'acide sulfurique.

Annexe2:

2.2 Cytométrie:

Le suivi du taux de LTCD4 et de l'expression du CD38 et HLA-DR a été fait par un cytomètre en flux à 4 couleurs, de marque Becton Dickinson.

-Verrerie :

Immunophenotypage des lymphocytes T au cours de l'infection à VIH

- Tube a fond rond

-Consommable :

- Pipettes et micropipettes fixes et variables.(250µl,100µl et 50µl)
- Embouts pour les pipettes.
- Tubes de prélèvements.
- Portoirs pour les tubes.
- Eau distillée.

-Solutions :

- Anticorps ,"MultiTest anti CD8, CD4, CD3, CD45 Becton Dickinson"
- Solution de lyse "BD FACS Lysing solution, Becton Dickinson"
- CellWash "Becton Dickinson"
- BD Facsflow "Becton Dickinson"

-Appareillages :

- Centrifugeuse "Rotafix 32A Hettich Zentrifugen"
- Vortex "WhirliMixer, laboratory FSA Suplies"
- Cytometre à 4 couleurs "BD Facscalibur" Becton Dickinson

Immunophenotypage des lymphocytes T au cours de l'infection à VIH

Immunophenotypage des lymphocytes T au cours de l'infection à VIH

Immunophenotypage des lymphocytes T au cours de l'infection à VIH
