

Université de Limoges
Faculté de Pharmacie

Année 1995



N° 27

**EVALUATION DU TEST ACCESS HIV 1/2
DANS LE SUIVI DES ENFANTS
NES DE MERES VIH SEROPOSITIVES**

THESE

**Pour le Diplôme de Docteur en Pharmacie
obtenu après soutenance du
MEMOIRE**

du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale

présenté et soutenu publiquement

le 15 juin 1995 à Toulouse

par

Melle Odile GOULESQUE

née le 26 février 1969 à Toulouse

JURY

Monsieur le Professeur BENOIST : Président

Monsieur le Professeur DUFFAUT : Membre

Madame le Professeur PUEL : Membre

Madame le Docteur TRICOIRE : Membre

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE:

Monsieur le Professeur RABY Claude

ASSESEURS:

Monsieur le Professeur GHESTEM Axel
Monsieur DREYFUSS Gilles – Maître de Conférences

PROFESSEURS:

BENEYTOUT Jean-Louis

BIOCHIMIE

BERNARD Michel

PHYSIQUE-BIOPHYSIQUE

BOSGIRAUD Claudine

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
PARASITOLOGIE

BROSSARD Claude

PHARMACOTECHNIE

BUXERAUD Jacques

CHIMIE ORGANIQUE
CHIMIE THERAPEUTIQUE

CHULIA Albert

PHARMACOGNOSIE

CHULIA Dominique

PHARMACOTECHNIE

DELAGE Christiane

CHIMIE GENERALE ET MINERALE

GHESTEM Axel

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE

HABRIOUX Gérard

BIOCHIMIE FONDAMENTALE

LACHATRE Gérard

TOXICOLOGIE

LEFORT DES YLOUSES Daniel

PHARMACIE GALENIQUE

MOESCH Christian

HYGIENE

LOUDART Nicole

PHARMACODYNAMIE

PENICAUT Bernard

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

RABY Claude

PHARMACIE CHIMIQUE ET CHIMIE ORGANIQUE

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE – CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

A Monsieur le Professeur Hervé BENOIST

**Professeur des Universités d'Immunologie à la Faculté
de Pharmacie de Toulouse**

Vous avez eu l'amabilité d'accepter de présider à notre jury de thèse.

Qu'il nous soit permis de vous exprimer notre reconnaissance et nos remerciements.

A Monsieur le Professeur Michel DUFFAUT

**Professeur des Universités de Sémiologie et Clinique
Médicale à la Faculté de Médecine de Toulouse
(Rangueil)**

Très sensible à l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail, nous tenons à vous exprimer toute notre gratitude et notre estime.

A Madame le Professeur Jacqueline PUEL

**Professeur des Universités de Virologie à la faculté de
Médecine de Toulouse (Purpan)**

Nous vous remercions de votre accueil dans votre laboratoire et de votre confiance. En dirigeant ce travail, vous nous avez apporté votre expérience et votre gentillesse pour nous procurer de précieux conseils.

Veillez trouver ici le témoignage de notre profonde reconnaissance.

A Madame le Docteur Joëlle TRICOIRE

**Praticien hospitalier du Service de Pédiatrie
au CHU Purpan**

Vous nous avez toujours accueilli avec amabilité et apporté votre aide avec compréhension et efficacité.

Vous avez accepté de juger ce travail.

Soyez assurée de notre reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Didier LHERITIER

Ancien Interne des Hôpitaux de Toulouse

Tu as fait preuve d'une grande disponibilité. La qualité de tes conseils et de ton aide m'a été précieuse pour la réalisation de ce travail.

Je te remercie pour ton soutien et ta gentillesse.

Au Personnel du Laboratoire de Virologie du CHU Purpan
pour leur accueil et leur précieuse aide.

Au Docteur Catherine MENGELLE
et au Docteur Jean-Michel MANSUY
du Laboratoire de Virologie du CHU Purpan,
pour leur gentillesse et leur amitié.

Au Docteur FREIER et au Docteur LAINÉ
du Laboratoire SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR
pour leur confiance et leur soutien.

Je dédie ce travail

à mes parents

en leur témoignant toute ma reconnaissance pour leurs encouragements et leur patience, tout au long de mes études.

à mon frère Bruno

à Anne FABREGUETTE

qui m'a aidé par son amitié à réussir le concours de l'Internat et m'a encouragé à le mener à bien.

**à Véronique MANSAT, Valérie REYREL,
Laurence VERONESE,
Loïc ROLLAND et Jean-Raoul KAMDEM-DJOKO,**

qui ont commencé leur Internat à Limoges en même temps que moi, et ont su par leur bonne humeur et leur amitié m'offrir quelques années inoubliables.

à ma Famille,

à mes Amis.

PLAN

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE

1. GENERALITES SUR LES VIRUS VIH 1 ET VIH 2

1.1 Structure et organisation génique

- 1.1.1 Morphologie
- 1.1.2 Organisation génique
- 1.1.3 Variabilité génétique

1.2 Réplication des virus VIH

- 1.2.1 Réplication virale proprement dite
 - Fixation du virus à la cellule cible
 - Pénétration du virus dans la cellule hôte
 - Production et libération du virion
- 1.2.2 Réplication et étapes de l'infection

2. TRANSMISSION MERE-ENFANT DU VIH

2.1 Modes de transmission périnatale

- 2.1.1 Transmission in utero
- 2.1.2 Contamination per partum
- 2.1.3 Transmission après la naissance

2.2 Incidence de la transmission verticale

2.3 Conséquences de la transmission périnatale

2.4 Modes de prévention de la contamination mère-enfant

3. DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE DE L'INFECTION VERTICALE A VIH

3.1 Détection des anticorps anti VIH

3.1.1 Les tests ELISA

3.1.2 Le western-blot

3.2 Détection de l'antigène p24 circulant

3.3 Culture du virus VIH

3.4 Détection du génôme viral par hybridation moléculaire

3.4.1 Hybridation in situ

3.4.2 Amplification génique

3.5 Production d'anticorps in vitro

3.6 Marqueurs non spécifiques de l'infection

3.6.1 Taux des lymphocytes CD4 et CD8

3.6.2 Hypergammaglobulinémie

3.6.3 B2 microglobuline et néoptérine

DEUXIEME PARTIE

1. MATERIEL ET METHODE

1.1 Echantillons testés sur le système ACCESS

1.1.1 Etude préliminaire

- Sujets séropositifs asymptomatiques
- Sujets séropositifs symptomatiques
- Sujets VIH séropositifs suivis pendant un an

1.1.2 Etude des prélèvements d'enfants nés de mères séropositives

- Enfants nés de mères VIH séropositives
- Pool de sérums séropositifs contenant des quantités croissantes de gammaglobulines

1.2 Système d'immunoanalyse ACCESS

1.2.1 Principe du test

1.2.2 Description du système ACCESS

2. RESULTATS

2.1 Etude préliminaire

2.1.1 Etudes de sujets VIH-1 séropositifs asymptomatiques et symptomatiques

2.1.2 Suivi de cinq sujets séropositifs pendant un an

2.2 Suivi des enfants nés de mères séropositives

2.2.1 Enfants non infectés

2.2.2 Enfants infectés

2.2.3 Comparaisons des valeurs de S/CO entre enfants infectés et non infectés

2.2.4 Dilutions de gammaglobulines dans un pool de sérums VIH séropositifs

3. DISCUSSION

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Depuis quelques années en France, les cas pédiatriques de syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) résultent le plus souvent d'une transmission périnatale du virus de la mère à l'enfant.

La transmission du virus du SIDA (VIH) par voie verticale constitue un véritable problème de santé publique, puisque le taux de transmission varie selon les pays et les études de 8 à 45 %. Le diagnostic ante natal de l'infection du fœtus n'est pas actuellement possible et le diagnostic post natal fait intervenir une association de différentes techniques, plus ou moins sensibles et spécifiques, ne permettant pas toujours de donner un diagnostic précoce.

Ce travail a permis d'évaluer le test sérologique de dépistage Access HIV 1/2, dans le suivi d'enfants nés de mères infectées par le virus du SIDA, de la naissance à l'âge de 18 mois et plus, et par ce biais de montrer l'aspect semi-quantitatif de cette technique utilisant comme système de révélation, la chimioluminescence.

Nous traiterons dans une première partie, des généralités sur les virus VIH 1 et 2, puis des modes de transmission mère-enfant et enfin des techniques de diagnostic. Dans la deuxième partie, nous présenterons notre travail sur l'automate ACCESS et le suivi sérologique de 42 enfants nés de mères VIH séropositives.

PREMIERE

PARTIE

GENERALITES SUR LES VIRUS VIH 1 ET VIH 2

Les virus de l'immunodéficience humaine VIH 1 et VIH 2 appartiennent à la famille des Rétrovirus et à la sous-famille des Lentivirinae. Ce sont des virus à ARN, possédant une enzyme, la reverse transcriptase qui permet de synthétiser un ADN double brin, complémentaire de l'ARN viral, dans la cellule infectée par un rétrovirus.

1.1 STRUCTURE ET ORGANISATION GENIQUE

1.1.1 MORPHOLOGIE

Les VIH sont des virus enveloppés de 80 à 120 nanomètres de diamètre, de forme sphérique (figure 1).

L'enveloppe est constituée d'une double couche phospholipidique à la surface de laquelle se trouvent deux glycoprotéines : une glycoprotéine transmembranaire, la gp41 pour VIH 1 et la gp36 pour VIH 2, et une glycoprotéine d'enveloppe externe, la gp120 pour VIH 1 et la gp125 pour VIH2.

Cette enveloppe est limitée intérieurement par une membrane ou protéine de matrice, qui est le facteur stabilisant de la particule virale mature.

Le core est de nature protéique et protège le génome constitué de deux simples brins d'ARN couplés à la reverse transcriptase et associés à une protéine p15, souvent elle-même dissociée en p9 et p7 pour VIH 1 (3).

1.1.2 ORGANISATION GÉNIQUE

Le génome compte plus de 9200 nucléotides et se compose de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' de trois gènes de structure, caractéristiques des Rétrovirus : *gag*, *pol*, *env* et d'autres gènes régulateurs : *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* et *vpu* pour VIH 1 ou *vpx* pour VIH 2, codant pour des protéines régulatrices de la multiplication virale (figure 2).

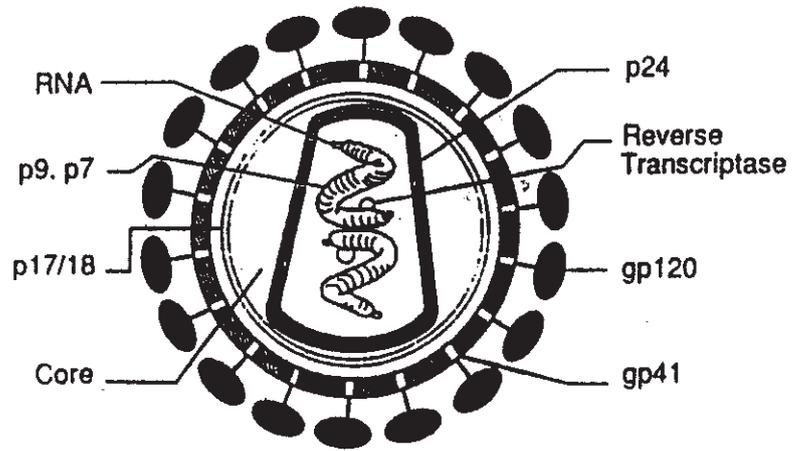


Figure 1 : Structure schématique des VIH

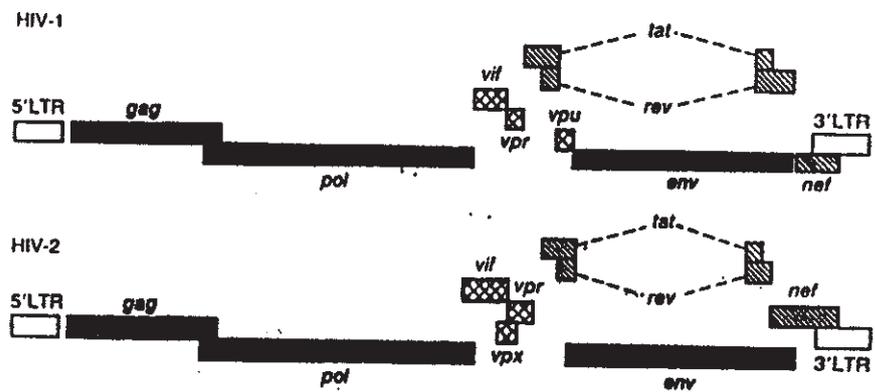


Figure 2 : Structure génétique de VIH 1 et VIH 2.

Les gènes de structure

Le gène *gag* (group antigen) synthétise une protéine précurseur de 55 kd, clivée par une protéase virale en 3 protéines constitutives du core :

- p17 pour VIH 1 ou p16 pour VIH 2 : nucléoprotéine N terminale
- p25 pour VIH 1 ou p26 pour VIH 2 : protéine majeure
- p13 pour VIH 1 ou p12 pour VIH 2 : nucléoprotéine C terminale (elle-même clivée en 2 protéines p6 et p9).

Le gène *pol* (polymérase) code pour différentes enzymes virales, qui sont respectivement de l'extrémité N terminale vers l'extrémité C terminale :

- la protéase p10
- la reverse transcriptase sous 2 formes : p64 et p51 pour VIH 1, p67 et p53 pour VIH 2, selon que lui est associée ou non, une activité ribonucléase H
- l'endonucléase ou intégrase p31.

Le gène *env* (enveloppe) code pour un précurseur glycosylé de 160 kd (gp160 pour VIH 1 et gp 150 pour VIH 2), clivé dans le cytoplasme par une protéase cellulaire en glycoprotéines :

- glycoprotéine d'enveloppe externe gp120 pour VIH 1 et gp125 pour VIH 2, dont la structure correspond au site de liaison au récepteur CD4
- glycoprotéine transmembranaire gp41 pour VIH 1 et gp36 pour VIH 2, qui jouent un rôle dans la fusion cellulaire (18).

Les gènes régulateurs

Ce sont plusieurs gènes plus petits, situés principalement dans la région centrale du génome.

Le gène *tat* (trans-activateur de la transcription) est nécessaire à la production d'une quantité suffisante d'ARN. Il code pour une protéine indispensable à l'infectivité du virus, dont le mécanisme d'action passe par son interaction avec les ARN viraux, en collaboration avec des facteurs cellulaires, et permet la synthèse de ces molécules d'ARN.

Le gène *rev* exerce une fonction de régulation différentielle, en codant pour la protéine *rev* grâce à deux séquences nucléotidiques éloignées, chacune ayant un rôle distinct : la CRS étant inhibitrice et la CAR levant cette inhibition. La protéine *rev* permet aux ARN d'échapper partiellement aux phénomènes de clivages et réassemblages aboutissant à la production de plusieurs classes d'ARN messagers. Ainsi en sa présence, les ARNm longs, codant pour les protéines de structure *gag* et *pol*, peuvent être exportés vers le cytoplasme et utilisés pour la synthèse de protéines. Pour être active la protéine *rev* doit s'accumuler et se multimériser au contact de l'ARN : il en résulte un effet de seuil et un délai avant que son action se produise. Au début de l'infection par le VIH, seul les ARN courts sont synthétisés, producteurs de *tat* et de *rev* ; après un délai , on voit apparaître les ARN longs. Ce système permet de retarder et de synchroniser l'expression des protéines virales les plus immunogènes, et ainsi de produire plus de virus avant que les cellules immunitaires puissent réagir.

Le gène *nef* (negative regulatory factor) serait responsable de la latence et du développement du SIDA, en modifiant les relations entre cellules infectées et cellules immunitaires et en affectant ainsi la visibilité du virus par l'immunité de l'hôte.

Le gène *vif* (virion infectivity factor) intervient dans la réplication virale et la protéine *vif* augmente l'infectivité des virus (18).

Tous ces gènes régulateurs agissent sur la multiplication virale mais interagissent entre eux.

Figure 3 : Action des gènes de régulation sur la réplication du VIH
(d'après Haseltine et Wong-Staal)

1.1.3 VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE

Il existe 2 virus VIH : le VIH 1 et le VIH 2. Au niveau génomique, il existe une homologie entre eux de 42 %. Au niveau des protéines virales, la divergence est très élevée entre VIH 1 et VIH 2 et ce, notamment au niveau des spécificités d'antigène d'enveloppe.

Les homologies de séquences peuvent se traduire par des réactions croisées entre sérums VIH 2 et protéines du VIH 1 et inversement, réactions révélées en ELISA, Western-blot ou RIA.

De plus, pour chacun des 2 VIH, il existe des variations au sein d'un même sérotype. En effet, grâce à l'étude des séquences d'enveloppe, on a pu mettre en évidence des variations en fonction des zones géographiques. De même au sein d'un même individu, des variations apparaissent en fonction des cellules et des tissus et en fonction du temps. Ainsi l'hétérogénéité des souches de VIH apparaît très importante entre variants retrouvés chez différents individus mais aussi dans un même organisme.

La variabilité est inégale selon la région du génome : le gène le plus variable est le gène *env*, codant pour la glycoprotéine d'enveloppe, notamment au niveau du fragment codant pour la partie externe de la gp120 (boucle V3). Au contraire, les régions les mieux conservées sont celles codant pour les protéines structurales internes (*gag*) et les fonctions enzymatiques (*pol*).

Cette variabilité résulte principalement de mutations ponctuelles disséminées, issues d'un taux élevé d'erreurs de lecture du ARN viral par la transcriptase réverse par défaut d'activité enzymatique de correction d'erreurs. De plus, la transcriptase réverse peut réaliser des sauts en avant (délétions), en arrière (répétitions) ou d'un RNA à l'autre (recombinaisons). In vivo, la réponse immunitaire réalise des pressions de sélection qui favorisent la variabilité génétique des VIH. Les mutations dans le génome du VIH peuvent se traduire par un échappement à la réponse immunitaire antivirale : certaines régions hypervariables du gène *env* (boucle V3) constituent une cible préférentielle pour les anticorps neutralisants ; des mutations ponctuelles spontanées, dans ces régions ou d'autres, peuvent produire des phénotypes résistants à ces anticorps. Ces phénomènes de variation génétique s'intègrent dans le phénomène de persistance de l'infection par échappement permanent aux défenses de l'hôte (10, 3).

1.2 REPLICATION DES VIRUS VIH

1.2.1 REPLICATION VIRALE PROPREMENT DITE

La réplication des virus de l'immunodéficience humaine se fait comme pour tous les virus au dépens d'une cellule hôte. Elle se fait en plusieurs étapes :

- fixation à la surface de la cellule cible,
- pénétration dans la cellule hôte,
- production et libération de virions.

Nous nous proposons de décrire le mode de réplication du VIH 1.

Fixation du virus à la cellule cible

La fixation du VIH 1 à la cellule cible se fait grâce à leurs glycoprotéines d'enveloppe, la gp120 et la gp41.

La glycoprotéine de surface gp120 interagit avec une très forte affinité avec le récepteur CD4 des lymphocytes auxiliaires mais aussi sur d'autres cellules de l'organisme : monocytes activés, lymphocytes B, promyélocytes, mégacaryocytes, cellules dendritiques, astrocytes, cellules des capillaires endothéliaux, oligodendrocytes, cellules de l'épithélium intestinal, cellules de Langerhans dans la peau... ces cellules possédant à des degrés plus ou moins grands la molécule CD4.

On distingue dans la gp120 plusieurs zones :

- un site creux reconnaissant le récepteur CD4,
- une boucle V3, une des régions les plus variables d'une souche à l'autre, qui joue un rôle dans l'infection et la fusion (18).

La glycoprotéine gp41 permet l'amarrage du récepteur CD4 à la particule virale et la perforation de la cellule hôte après reconnaissance CD4-gp120. Elle a ainsi un rôle prépondérant dans la fusion entre enveloppe virale et membrane cellulaire (10).

Pénétration du virus dans la cellule hôte

Après adsorption, la pénétration du virus se fait par fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire. Cette fusion est catalysée par l'extrémité N-terminale de la gp41 (18).

D'autres modes de pénétration dans la cellule ont été décrits.

Production et libération du virion

Intégration génomique

Après pénétration de la nucléoprotéine dans le cytoplasme, il y a activation de la transcriptase réverse, génération d'un hybride ARN-ADN détruit par la ribonucléase et enfin formation de l'ADN viral double brin. Il y a un phénomène d'élongation de l'ADN par rapport à l'ARN, du à la duplication des composantes des LTR (Long Terminal Repeat), qui encadrent le génome viral. Ce sont les sites de circularisation et d'intégration du génome dans le chromosome cellulaire.

L'ADN ainsi transcrit passe ensuite dans le noyau de la cellule où il se circularise et va s'intégrer dans l'ADN cellulaire au hasard, grâce à l'action intégrase de la transcriptase réverse.

A ce stade le provirus peut classiquement, soit rester complètement latent sans s'exprimer et être simplement transmis aux cellules filles, soit se répliquer sous l'influence de différents facteurs viraux et cellulaires (10, 18).

Cycle productif de virion

Sous l'influence de facteurs déclenchants encore mal connus, la transcription est réalisée par l'ARN polymérase II cellulaire.

Les ARN messagers précoces vont coder pour les protéines de régulation, notamment tat, rev et nef. Les ARNm tardifs vont produire les protéines de structure. L'ARNm env, recouvrant tout le gène env est traduit en un précurseur protéique de poids moléculaire 160.000 daltons, la gp160. Elle sera clivée après assemblage des virions en gp120 et gp41.

Les gènes *gag* et *pol* sont recouverts par un seul ARNm long, qui code pour un précurseur protéique, clivé par la protéase virale en protéine précurseur de gag (p55) puis en p24, p18 et p15 et pour les protéines codées par le gène pol en protéase, transcriptase réverse, RNase H et intégrase ou endonucléase.

En même temps, la transcription complète du génome produit l'ARN génomique. Les copies de l'ARN génomique et des ARNm migrent vers le cytoplasme où ces derniers sont transcrits en protéines grâce aux ribosomes cellulaires. Les protéines d'enveloppe entrent dans le réticulum endoplasmique, suivent l'appareil de Golgi et sont acheminées vers la

membrane cytoplasmique. Les protéines gag sont dans le cytosol. Les protéines formées et l'ARN génomique sont alors assemblés pour donner des structures sphériques, les particules virales complètes, qui bourgeonnent au niveau de la membrane cellulaire. En sortant de la cellule, le virus s'enveloppe, retrouvant les constituants de l'enveloppe qui ont été transportés et insérés au niveau de la membrane cellulaire.

Les particules libérées vont pouvoir infecter d'autres cellules cibles de l'organisme (3, 10, 18).

1.2.2 REPLICATION ET ETAPES DE L'INFECTION

A la suite d'un contact avec le virus de l'immunodéficience humaine, survient la primo-infection qui correspond à la dissémination du virus dans les organes lymphoïdes (28).

La séroconversion apparaît dans les trois semaines à trois mois après le contagage, plus exceptionnellement, après trois mois voire des années (18). Avant l'apparition des anticorps, le virus est présent, il est détecté soit par l'antigénémie p24, avant que celui-ci soit complexé avec les anticorps spécifiques du VIH soit par coculture ou par amplification génique (PCR) (71).

La primo-infection peut être asymptomatique chez 50 à 75 % des adultes. Les symptômes surviennent 2 à 6 semaines après le contagage et durent en moyenne 1 à 2 semaines (71, 28). La symptomatologie de la primo-infection a initialement été décrite comme un syndrome pseudo-monucléosique chez l'adulte. Il est maintenant clair que c'est un syndrome distinct, typiquement caractérisé par une fièvre, une léthargie, des malaises, des myalgies, des maux de tête, des douleurs rétro-orbitales, une photophobie, des maux de gorge, des adénopathies généralisées mais plus souvent axillaires, cervicales ou occipitales (70 % des cas) et une éruption cutanée maculopapuleuse par infiltrat de cellules CD4+. Des méningoencéphalites aseptiques ont été également décrites. Ces principaux signes cliniques reflètent bien la nature lymphocytopathique et neuropathique du virus du SIDA (71).

D'un point de vue virologique et immunologique, on observe, durant cette période post-contagage, une antigénémie p24 maximale entre la troisième et la sixième semaine, d'évolution opposée à une chute modeste du nombre

de lymphocytes totaux et de lymphocytes CD4+. Contrairement à la chute des lymphocytes CD4+, on note une forte croissance de la population lymphocytaire CD8+ et une inversion du rapport CD4+/CD8+ (71).

Par la suite, l'antigénémie p24 décroît avec la synthèse des anticorps spécifiques du VIH, le taux de lymphocytes CD4+ augmente, tandis que le taux de lymphocytes CD8+ revient presque à la normalité, tout en restant légèrement supérieur au taux de lymphocytes CD4+ et en maintenant le rapport CD4+/CD8+ inversé (29). Les chutes de l'antigénémie p24 et de la virémie en fin de séroconversion sont en faveur d'une réponse immunologique favorable à la primo-infection par VIH. Le mécanisme de la clairance virale n'est pas élucidé mais il apparaît que la réponse immunitaire cellulaire et humorale ainsi que la réponse des cytokines sont très importantes.

A ce stade, le sujet infecté est séropositif et entre dans la phase de latence clinique, pendant laquelle le virus semble se multiplier à bas bruit.

Les facteurs prédictifs de l'entrée dans la phase de progression vers le SIDA sont maintenant bien connus et font partie du suivi du sujet séropositif. Ils font appel aussi bien à l'immunité cellulaire qu'à l'immunité humorale. La chute du taux de lymphocytes CD4+ en valeur absolue est considéré comme le facteur prédictif le plus significatif. Le taux des lymphocytes CD8 est également bien corrélé à celui des CD4+ et constitue un bon élément de pronostic au même titre que l'inversion du rapport CD4+ / CD8+ (30). Les mécanismes de déplétion et de malfonction des lymphocytes CD4+ semblent très complexes (28).

En plus de la détérioration de l'immunité cellulaire, il apparaît des perturbations au niveau humoral, comme la disparition des anticorps spécifiques du VIH, notamment celle des anticorps anti p24, qui semble être en rapport avec l'apparition et la croissance de l'antigénémie p24. La chute des anticorps anti p24 est étroitement liée au niveau de l'antigénémie p24 ; ces deux éléments étant eux-mêmes corrélés à la déplétion des lymphocytes CD4+. En western-blot, les bandes spécifiques des antigènes de core s'estompent petit à petit (p24, p53) lors de l'évolution vers le SIDA (30).

Contrairement à la chute des anticorps spécifiques du VIH, il faut noter la survenue d'une hypergammaglobulinémie, ainsi qu'une augmentation du taux des Ig M et des Ig A totales. Cependant l'élévation des Ig D totales est le

marqueur le plus précoce des différentes classes d'immunoglobulines et se situe en moyenne à huit fois le taux normal. Elle reflète l'activation des lymphocytes B qui survient tôt dans la pathogénie de l'infection VIH, c'est à dire peu avant le développement des symptômes. Le taux des Ig D décroît chez les sujets symptomatiques mais reste cependant supérieur à la normale (51).

TRANSMISSION MERE-ENFANT DU VIH

Actuellement, la majorité (75 à 80 %) des enfants infectés par le virus du SIDA l'ont été par transmission verticale, les 20 à 25 % restant ont été infectés par administration de produits sanguins ou de leurs dérivés, ce type de contamination étant de moins en moins fréquente en France compte-tenu de la mise en place du dépistage systématique depuis août 1985 et de l'inactivation virale des produits sanguins (43, 65). Le Center of Disease Control définit le SIDA en Pédiatrie comme la pathologie touchant les enfants de moins de 13 ans, excluant ainsi la population de 13 à 21 ans, qui comprend les adolescents infectés par le VIH par pratiques sexuelles ou par consommation intraveineuse de drogue.

En 1983, les premiers cas de SIDA inexplicables chez de jeunes enfants ont été décrits aux Etats-Unis, mais à ce moment-là, les connaissances sur l'épidémiologie de cette nouvelle maladie ne permettaient pas d'incriminer une transmission du VIH de la mère à l'enfant (55). Aujourd'hui, le mode de transmission périnatale du VIH prend de plus en plus d'importance du fait de la prédominance de la transmission hétérosexuelle.

Nous traiterons dans ce chapitre, les différents modes de transmission mère-enfant du VIH, l'incidence et les conséquences de cette transmission ainsi que sa prévention.

2.1 MODES DE TRANSMISSION PERINATALE

Le terme de transmission périnatale reflète bien la confusion qui existe pour distinguer les trois types de transmission mère-enfant du VIH :

- la transmission in utero,
- la transmission per partum,
- la transmission après la naissance.

2.1.1 TRANSMISSION IN UTERO

La détection de virus VIH-1 dans des tissus de 3 embryons de 8 semaines (49) et de foetus du deuxième trimestre de grossesse (69) de femmes séropositives est en faveur d'une contamination transplacentaire précoce. Le mécanisme de l'infection de l'embryon ou du foetus reste encore inconnu : certaines équipes pensent à un passage à travers le placenta en s'appuyant sur la détection du virus dans ce tissu, mais le risque de contamination du placenta par le sang de la mère ne peut être exclu (38, 58, 33). Il semblerait que le transfert du virus au foetus se fasse par l'intermédiaire des cellules trophoblastiques situées à l'interface des circulations maternelles et fœtales : des récepteurs CD4 ont été retrouvés sur des trophoblastes en culture, issus de foetus du premier trimestre de grossesse (49). D'après Lewis et coll., plusieurs hypothèses expliqueraient le mécanisme d'accès du VIH au trophoblaste :

- le virus est libéré dans la circulation maternelle à partir de cellules déciduales CD4+ et de macrophages, ainsi les virions libres seraient phagocytés par le syncytiotrophoblaste,
- le trophoblaste envahissant le tissu décidual pourrait venir en contact de cellules maternelles infectées par le virus, qui pourrait ensuite infecter le trophoblaste et le mésenchyme villositaire,
- les macrophages maternels infectés pourraient envahir le stroma villositaire.

La positivité des techniques de détection du virus ou de son génome (polymerase chain reaction ou culture du VIH) à la naissance, dans le sang du nouveau-né serait en faveur d'une contamination précoce durant le premier ou deuxième trimestre de la grossesse (44). Il semblerait cependant que les contaminations très précoces soient rares.

La négativité des résultats de ces techniques, sans pouvoir douter de leur sensibilité, durant la première semaine de vie de l'enfant suggère une contamination tardive en fin de troisième trimestre de grossesse, voire à l'accouchement (15). Devant l'absence de résultats positifs de recherche du virus (culture ou PCR) dans les prélèvements réalisés sur foetus ou à la naissance, certaines équipes considèrent que "dans la plupart des cas, la transmission se déroule près ou à l'accouchement" (23, 24).

Une étude portant sur 95 enfants infectés nés de mères VIH séropositives, suivis durant les trois premiers mois de vie, utilise le modèle statistique de

Markov pour montrer que la transmission mère-enfant se situe à l'accouchement dans 65 % des cas et in utero dans 35 % des cas dont 95 % de contamination moins de 56 jours avant la naissance (63). Toutefois on ne peut rejeter les hypothèses de latence du virus (sans réplication) ou d'accumulation dans les cellules non circulantes de type cellules progénitrices hématopoiétiques (44).

2.1.2 CONTAMINATION PER PARTUM

La présence du virus du SIDA dans le liquide amniotique et les sécrétions vaginales, ainsi que le contact incontournable du nouveau-né avec le sang de la mère au moment de l'accouchement par voie naturelle ou par Césarienne rendent la transmission du VIH à la naissance très plausible (65). Cependant les méthodes de diagnostic disponibles ne permettent pas de confirmer cette hypothèse.

En effet, la négativité de la PCR ou de la culture du VIH à la naissance n'autorisent pas à conclure de l'infection au cours de l'accouchement (42).

2.1.3 TRANSMISSION APRES LA NAISSANCE

Ce mode de transmission immédiatement après la naissance est essentiellement dû à l'allaitement. Dès 1985, le virus a été isolé de lait maternel dépourvu de cellules, provenant de trois sujets infectés asymptomatiques (70). Depuis, plusieurs études ont décrit des cas de femmes connues comme non infectées à la naissance de leur enfant, mais qui ont présenté une séroconversion VIH après l'accouchement (transfusion sanguine, abus de drogue par voie parentérale). Les enfants allaités ont également été infectés (65, 14). Dans les pays industrialisés où l'allaitement est fortement déconseillé en cas de séropositivité de la mère, il est impossible de mener une étude prospective en raison d'un problème éthique évident (12, 21). En revanche dans les pays pauvres, en voie de développement, notamment en Afrique, où le mode de contamination prédominant est hétérosexuel et où la contamination mère-enfant est un problème majeur, il est difficile d'interdire l'allaitement en raison des conditions économiques (65).

Une étude prospective menée au Rwanda, portant sur 16 femmes allaitant pour lesquelles la séroconversion a été diagnostiquée après l'accouchement,

montre un taux de transmission post-natale du virus de 45 % et de 60 % si on tient compte ou pas des séroconversions maternelles apparues dans les trois premiers mois suivant la naissance. De plus, il est rapporté le cas d'une transmission de la mère à l'enfant par allaitement, plus d'un an après le pic virémique associé à une primo-infection récente : la mère présentait en effet un abcès mammaire. L'ingestion de cellules de l'inflammation pourrait avoir contribué à la contamination de l'enfant (76). D'après certaines équipes, la majoration du risque de transmission périnatale du virus du SIDA serait estimée à 14 % en cas d'allaitement de l'enfant par sa mère séropositive (22). D'autres considèrent que la durée d'allaitement est à prendre en compte pour cette estimation (14).

2.2 INCIDENCE DE LA TRANSMISSION VERTICALE

Il est difficile d'évaluer l'incidence de la transmission de la mère séropositive à l'enfant, compte-tenu des différences de méthodes utilisées dans les diverses études existant. En effet, les pourcentages de contamination par le VIH des enfants nés de mères séropositives varient de 8 à 65 % (65). A Miami, aux Etats-Unis, une étude, basée sur le suivi de 82 enfants nés de mères infectées par VIH 1, montre un taux de transmission verticale de 30 % (39), sensiblement identique à celui obtenu dans une étude menée à Baltimore (23 %) (53) ainsi que dans celle du HIV Infection in Newborns French Collaborative Study Group (27 %) (6) ou du Italian Register for HIV Infection in Children (30,3 %) (73). Au contraire, l'European Collaborative Study présente un taux de transmission évalué sur 372 enfants suivis jusqu'à l'âge de 18 mois, de seulement 12,9 % (26).

Il apparaît plusieurs facteurs de risque qui semblent augmenter la fréquence de transmission. En dehors de la taille de l'échantillon analysé, il faut noter des variations importantes en fonction du niveau socio-économique d'où sont issus les nouveau-nés. Une étude réalisée au Zaïre dans deux hôpitaux, pour lesquels le recrutement des patients faisait intervenir leur niveau social montre que pour les enfants nés de mères séropositives de niveau social moyen voire

élevé, le taux de transmission était modéré (environ 30 %), tandis que dans l'autre établissement recevant des patientes de faibles ressources économiques, ce taux de transmission atteignait 50 %. De plus dans ce dernier hôpital, le risque létal avant l'âge de un an était d'autant plus important pour ces enfants (66).

Dans deux études françaises multicentriques, il apparait nettement que le risque de transmission in utero (63), de même que le taux de progression de la pathologie chez l'enfant (5), sont directement liés au degré d'immunodéficience acquise de la mère à l'accouchement.

Certains auteurs ont découvert une corrélation entre le taux de transmission et un déficit en anticorps neutralisants anti gp 120 chez la mère (20, 62).

En outre, une étude de l'Italian Register for HIV Infection Children montre qu'un enfant d'une deuxième ou troisième grossesse de mère séropositive a plus de risque d'être infecté, si l'aîné de la fratrie était déjà infecté par le VIH (42,3 %), que s'il était non infecté (12,5 %). Ceci dit, 22,2 % des aînés de la fratrie contre 23,8 % des seconds ou troisièmes enfants étaient infectés. Chez les enfants jumeaux, ils retrouvent un taux de transmission de 25 %. Cependant il existe un fort risque de contamination des deux, si l'un des jumeaux est infecté (13).

2.3 CONSEQUENCES DE LA TRANSMISSION PERINATALE

En 1990, l'Organisation Mondiale de la Santé estimait environ cinq cent mille cas de SIDA mère-enfant et un million d'enfants non infectés futurs orphelins de parents décédés du SIDA. Dans certains pays africains ou sud américains, le SIDA de l'enfant constitue un véritable fléau, en raison de la prédominance de la contamination hétérosexuelle. En Europe et en Amérique du Nord, on assiste à une augmentation des cas de SIDA par transmission mère-enfant (54).

Une étude menée au Rwanda démontre qu'il n'y a pas de différence concernant les taux de prématurité, de bas poids des enfants, de malformations congénitales ou de morts néonatales entre les grossesses de femmes séronégatives et séropositives. En revanche, le poids moyen des enfants nés de mères séropositives est sensiblement inférieur (130 g à 290 g)

à celui de ceux nés de mères séronégatives (46, 47).

Au contraire une étude réalisée au Zaïre donne des résultats opposés : un bas poids à la naissance, la prématurité, un faible rapport de la circonférence de la tête sur la taille et une chorioamniotite seraient plus fréquents chez les enfants nés de mères séropositives (66).

Chez les enfants infectés par le VIH, le poids, la taille, la circonférence de la tête ou le taux de malformations ne sont pas significativement différents de ceux des enfants non infectés, nés de mères séropositives (5). Aussi cliniquement il est difficile de préjuger du statut de l'enfant à la naissance.

En 1987, une classification a été élaborée par le Center Disease Control pour le SIDA de l'enfant de moins de 13 ans, définissant trois grands stades de l'infection néonatale (9).

A la naissance, les enfants nés de mères séropositives sont classés P0 (statut VIH indéterminé) et le restent tant que la preuve clinique ou biologique de l'infection n'est pas faite.

Les anomalies immunitaires pouvant apparaître chez les enfants infectés sont : une baisse du taux de lymphocytes CD4+ (tableau 1), une hypergammaglobulinémie en dehors de celle observée à la naissance chez tous les enfants et qui est physiologique, une inefficacité partielle ou totale de la réponse immunitaire à une stimulation antigénique à but vaccinal (4).

Tableau 1: Définition du déficit immunitaire sévère

Age	Nombre de lymphocytes CD4 (normes ACTG)
< 2 ans	< 750 / mm ³
2 à 6 ans	< 500 / mm ³
> 6 ans	< 200 / mm ³

P0	STATUT VIH INDETERMINE
P1	<p style="text-align: center;">INFECTION CERTAINE ENFANT ASYMPTOMATIQUE</p> <p>P1 a : sans anomalies immunitaires P1 b : avec anomalies immunitaires</p>
P2	<p style="text-align: center;">INFECTION CERTAINE ENFANT SYMPTOMATIQUE</p> <p>P2 a : symptomatologie non spécifique (polyadénopathies, hépatomégalie, diarrhée...)</p> <p>P2 b : encéphalopathie spécifique</p> <p>P2 c : pneumopathie lymphoïde</p> <p>P2 d : infection</p> <p style="padding-left: 20px;">d1 : opportuniste</p> <p style="padding-left: 20px;">d2 : bactérienne sévère et/ou répétée</p> <p style="padding-left: 20px;">d3 : autres</p> <p>P2 e : cancers associés</p> <p>P2 f : autres symptômes</p> <ul style="list-style-type: none"> - thrombopénie - cardiopathie - néphropathie

Tableau 2 : Stades de l'infection VIH chez les enfants

Les enfants infectés par le VIH dans la période périnatale ne développent pas nécessairement un SIDA, rapidement après la naissance. Il apparaît dans une étude italienne que 75 % des enfants infectés survivent jusqu'à l'âge de 5 ans et 60 % jusqu'à l'âge de 10 ans (40).

2.4 MODES DE PREVENTION DE LA CONTAMINATION MERE-ENFANT

En l'absence de traitement curatif efficace, seule une prévention primaire serait actuellement possible. Cela signifierait décourager les femmes séropositives en âge de procréer d'avoir des enfants, après un dépistage systématique ou bien proposer l'avortement à celles reconnues séropositives pendant le premier trimestre de grossesse. Le diagnostic anténatal étant impossible, les mères refusent souvent l'interruption de grossesse pour cette raison (65).

Dans le cas d'une grossesse menée à terme, les moyens de prévention sont peu nombreux et leur efficacité contestée.

Il semblerait que la pratique de la césarienne à l'accouchement minimise le risque de transmission du virus de la mère à l'enfant. En effet, nous avons vu précédemment que la contamination tardive de l'enfant se situerait en fin de troisième semestre voire à la délivrance par contact massif avec le sang maternel et les sécrétions vaginales infectées. Des études réalisées sur des cohortes importantes dans des pays développés, montrent un pourcentage plus faible d'enfants infectés après une césarienne, sans pour autant trouver de différence significative entre voie naturelle et césarienne (72).

La question de la nécessité et de l'efficacité de la césarienne reste toujours en suspens, d'autant plus que des perspectives plus attractives sûrement comme la prévention pendant la grossesse par thérapie antivirale ou par immunoglobulines de type G anti-VIH mono ou polyclonales font l'objet d'études plus nombreuses.

La prévention de la contamination post natale consiste à interdire l'allaitement maternel et à suivre des règles d'hygiène élémentaires comme dans le cas de tout sujet séropositif vis à vis de son entourage. En France, les dons de lait

maternel sont soumis aux mêmes conditions que les dons du sang : interrogatoire du sujet, dépistage sérologique du VIH, propositions de prévention déjà émises en 1987 (48).

Récemment, les résultats partiels d'une étude menée aux Etats-Unis et en France par l'Agence Nationale de Recherche sur le SIDA (ANRS) et l'Aids Clinical Trial Group (ACTG), ont incité l'Agence du Médicament à étendre l'utilisation de l'AZT ou Rétrovir, molécule anti-rétrovirale, à la femme enceinte séropositive asymptomatique dont le taux de lymphocytes CD4 est supérieur à 200/mm³ et ayant décidé de poursuivre sa grossesse. L'enfant recevra également de l'AZT pendant les 6 premières semaines de vie et devra faire l'objet d'un suivi à long terme quelque soit son statut : infecté ou non. D'après les premiers résultats de l'étude, le taux de transmission materno-foetale serait réduit des deux tiers (8% au lieu de 25,5%). En l'absence de suppression totale de la transmission verticale du VIH, le Ministère de la Santé rappelle que la grossesse chez la femme séropositive doit être découragée (77).

Alors que la prévention est relativement applicable dans les pays développés (accès à la contraception, information du public, dépistage des femmes en début de grossesse et suivi régulier...), il est bien évident que pour les pays en voie de développement, la prévention reste très limitée en raison des conditions socio-économiques.

DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE DE L'INFECTION VERTICALE A VIH

Nous avons vu précédemment que le taux de transmission verticale du VIH varie selon les études de 8 à 45 %. La plupart des enfants étant asymptomatiques à la naissance, il est difficile de déceler cliniquement l'infection à VIH dans la période néonatale.

Actuellement, il n'existe pas de test de laboratoire standardisé, capable de donner une réponse suffisamment sensible et spécifique pour permettre à lui seul de poser le diagnostic. Au contraire, le diagnostic est obtenu par l'association de plusieurs techniques, que nous nous proposons d'exposer.

3.1 DETECTION DES ANTICORPS ANTI VIH

Plusieurs techniques de sérologie sont utilisées, dont l'immunoenzymologie (ELISA), l'immunofluorescence, l'agglutination de particules, l'immunotransfert (western-blot) et la radioimmunoprécipitation (RIPA). Les techniques conventionnelles ELISA ou western-blot détectent les immunoglobulines de la classe G (Ig G). Les IgG de la mère, passant la barrière placentaire, peuvent persister chez l'enfant non infecté au delà de 18 mois (75).

3.1.1 LES TESTS ELISA

Ces tests sont des techniques de dépistage, donnant une réponse qualitative pour la sérologie VIH. Elles utilisent pour la majorité un mélange de protéines virales purifiées obtenues par culture du virus, des protéines recombinantes ou des peptides synthétiques (16). Ces techniques présentent deux grandes limites. D'une part, elles ne sont pas toujours très spécifiques et peuvent donner des résultats faussement positifs, notamment dans le cas de pathologies autoimmunes, de polytransfusion ou de grossesse. D'autre part, il existe un délai de détectabilité des anticorps anti VIH, dans les phénomènes de séroconversion, par manque de sensibilité, selon les kits (60). La sensibilité et la spécificité ont été améliorées au fil des années, pour obtenir des tests de troisième génération plus satisfaisants.

Pour ces raisons en France, un dépistage doit être légalement réalisé avec deux techniques différentes, vérifié sur un deuxième prélèvement en cas de positivité ou de doute et confirmé par un western-blot ou plus rarement un RIPA.

Les Ig M et les Ig A ne traversent pas la barrière foéto-maternelle, mais les tests de dépistage des Ig M chez l'enfant se sont montrés décevants par manque de sensibilité (50 % des enfants infectés dans les 3 à 4 premiers mois de la vie). En revanche, la recherche des Ig A spécifiques, notamment par western-blot semble plus sensible et reproductible (75).

De même des équipes se sont penchées sur l'évolution des différentes classes d'IgG au cours de la première année de vie. Il semblerait que les IgG3 présentent un intérêt dans le diagnostic précoce de l'infection par le VIH : la clairance des IgG3 maternelle est relativement rapide, puisque chez les enfants non infectés les IgG3 spécifiques disparaissent dans les 28 semaines après la naissance, tandis que chez les enfants infectés, les IgG3 persistent (2, 41).

3.1.2 LE WESTERN-BLOT

C'est la technique de confirmation la plus utilisée. Les bandes de western-blot sont réalisées à partir d'une culture de virus VIH après purification virale, séparation électrophorétique des protéines virales selon leur poids moléculaire et transfert sur une feuille de nitrocellulose. La feuille est découpée en bandelettes dans le sens de la migration. Les anticorps présents dans le sérum du sujet étudié provoque une fixation de ceux-ci en fonction de leur spécificité (figure 4). Leur présence est révélée par une réaction enzymatique couplée à un chromogène (16).

L'interprétation est faite grace à des critères bien précis :

- le western-blot est positif, si le sérum reconnaît les produits des gènes suivants (au moins un) : *env + gag + pol*

env + gag

env + pol

env (au moins deux antigènes)

- le western-blot est indéterminé, s'il y a présence d'anticorps contre les produits des gènes : *gag + pol*

gag

pol

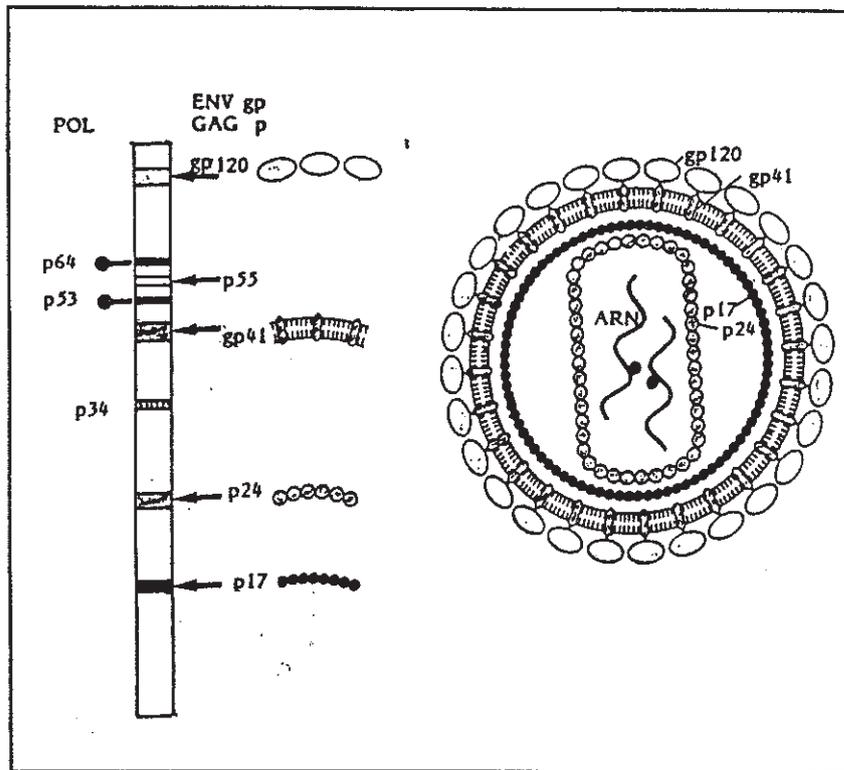


Figure 4 : Structure du VIH et répartition des protéines et des glycoprotéines virales en fonction de leur poids moléculaire sur la bande de western-blot.

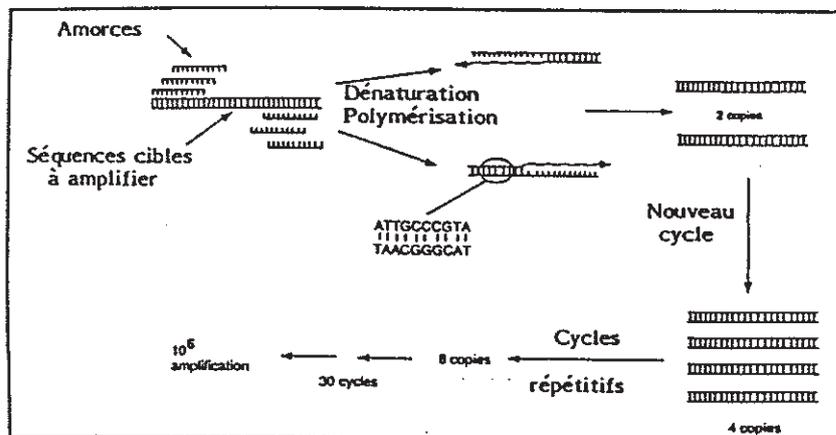


Figure 5 : Principe de la polymérase chain reaction ou PCR

- le western-blot est négatif en l'absence de reconnaissance des trois classes d'antigènes (*env*, *gag*, *pol*).

Certaines équipes se sont employées à la mise au point de western-blot quantitatifs. Il s'agit d'une lecture densitométrique du western-blot, par réflexion, donnant une approche quantitative de chaque bande. Les résultats de la lecture sont transmis à un micro-ordinateur, capable de les exprimer selon une courbe avec des pics, correspondants à chaque bande du western-blot et donc à la quantité d'anticorps spécifique fixé à l'antigène du VIH complémentaire. En suivant ainsi 18 patients séropositifs tous asymptomatiques au début de l'étude, dont la moitié a évolué vers un SIDA, il a été confirmé que les chutes des anticorps anti p24 et anti p17 sont les critères donnant la plus précoce prédiction de progression vers la phase SIDA (67). Le suivi des enfants par cette technique semble intéressant, notamment chez les enfants présumés non infectés pour mettre en évidence la perte des anticorps maternels, mais aussi pour les enfants infectés, au même titre que chez les adultes, comme facteur de pronostic.

Ces techniques de détection des anticorps anti VIH pour le diagnostic de l'infection verticale chez le jeune enfant sont beaucoup moins intéressantes que chez l'adulte. En effet, les anticorps de type Ig G de la mère peuvent persister au delà de 18 mois chez l'enfant. Environ 75 % des enfants non infectés sont séronégatifs à l'âge de 12 mois (60). Peut-on estimer un enfant comme non infecté, si les sérologies VIH se négativent en ELISA et en western-blot ? Il peut arriver que chez des enfants infectés par le VIH, les sérologies deviennent négatives, dans le cadre d'une hypogamaglobulinémie (60). Il serait dangereux d'interpréter ces résultats en l'absence d'un examen clinique de l'enfant et d'examen virologiques et immunologiques complémentaires. En revanche, ces techniques, et en particulier le western-blot, permettent de suivre la chute des anticorps chez les enfants nés de mère VIH séropositives et éventuellement, chez les enfants infectés, la remontée des taux par production de leurs propres anticorps.

3.2 DETECTION DE L'ANTIGÈNE P24 CIRCULANT

La recherche de l'antigénémie p24 est réalisée grâce à des techniques immunoenzymatiques avec immunocapture. La présence de l'antigène p24

chez le nouveau-né infecté par le VIH, est le reflet d'une réplication active du virus; cependant celui-ci peut être complexé et masqué par l'anticorps anti p24 d'origine maternelle. Aussi, une dissociation des immuns complexes par traitement acide est préférable avant de rechercher l'antigénémie p24 (59).

La détection de l'antigénémie p24 après dissociation apparaît moins sensible dans le premier mois de vie que la culture du virus et la PCR pour le diagnostic de l'infection verticale par le VIH (59). Pendant les deux premiers mois de vie, l'antigénémie p24 n'est détectée que chez 50 % des enfants infectés, alors qu'à 6 mois près de 90 % des échantillons sanguins sont positifs (37). Au delà du premier mois, la sensibilité et la spécificité sont nettement améliorées, respectivement 88,3 % et 99,0 % (59). De plus la spécificité pour le VIH 1 du test le rend inutile pour le suivi des enfants nés de mère VIH-2 séropositives (68).

La détection de l'antigène p24 circulant reste une technique simple de réalisation, rapide et relativement peu coûteuse (56, 59).

Elle a un intérêt limité, non associée aux autres techniques, dans le diagnostic précoce de l'infection verticale par le VIH, mais est utilisée comme élément pronostic et pour l'évaluation de l'efficacité du traitement antiviral (25, 59, 37).

3.3 CULTURE DU VIRUS VIH

Les techniques de culture des virus du SIDA sont complexes, laborieuses, lentes et coûteuses, nécessitant une unité de haute sécurité (P2 ou P3). Aussi rares sont les laboratoires qui réalisent la culture des VIH.

Bien que la présence du virus ait été décrite dans différents types de cellules ou liquides biologiques, la culture est le plus souvent pratiquée sur les cellules mononucléées du sang périphérique, en particulier les lymphocytes (on estime que 0,01 % des cellules mononucléées sanguines sont infectées) (16).

Sur le prélèvement sanguin recueilli sur héparine (actuellement dans le cas des enfants : 2 millilitres), les cellules mononucléées sont recueillies et lavées après séparation par la technique du Ficoll. Les différentes techniques de culture utilisent une coculture des cellules mononucléées sanguines du patient avec des cellules mononucléées sanguines normales et non infectées

par le VIH, provenant de donneurs, préalablement stimulés par la phytohémagglutinine. La coculture est réalisée en présence de mitogènes et d'interleukine 2, qui sont nécessaires à la croissance des lymphocytes T in vitro. La production de virus du SIDA en culture est détectée par la présence d'antigène VIH (antigénémie p24) ou d'enzyme virale, la réverse transcriptase dans le milieu de culture (60).

La culture du VIH est généralement réalisée à la naissance sur le sang du cordon, puis sur sang périphérique dans les 5 premiers jours de vie de l'enfant, à 1 mois, 2 mois, 3 mois et 6 mois. Elle peut être réalisée par coculture soit à partir des cellules mononuclées du sang périphérique, soit à partir du plasma, en donnant des résultats sensiblement identiques (64). La culture sur sang du cordon pose le problème d'une éventuelle contamination du prélèvement par la circulation maternelle ; aussi un résultat positif seul ne peut permettre de conclure à l'infection du nouveau-né par le VIH (60).

Contrairement aux adultes, la corrélation entre virémie quantitative et degré d'immunodéficience (taux de lymphocytes CD4) est discutée (1, 31). Le titre infectieux correspond à la quantité de virus capable d'infecter 50 % du tissu mis en culture (TCID 50 = tissu culture infectieux dose 50 %) et exprimée en TCID 50 / ml de plasma ou en TCID 50 / 10⁶ cellules (31).

Une étude menée sur 36 enfants infectés nés de mère VIH 1 séropositives présente une sensibilité de 90 % pour la culture réalisée dans les 15 premiers jours suivant la naissance et de 100 % dans les 4 mois. Il semblerait que la virémie soit élevée durant les premiers mois de vie du nouveau-né (8, 50).. D'après certains auteurs, l'isolement du virus VIH dans le sang du cordon ou dans les prélèvements sanguins effectués juste après la naissance est en faveur d'une contamination in utero , tandis que l'isolement aux alentours du deuxième mois de vie est en faveur d'une contamination à l'accouchement ou in utero tardive. La positivité tardive de la culture peut refléter une séquestration précoce du virus dans un compartiment inaccessible par les prélèvements sanguins ou une charge virale en dessous des limites de détection des techniques employées (50).

Il a été trouvé des résultats faussement positifs en coculture et en PCR, chez des enfants asymptomatiques et devenus séronégatifs. Le réisolement du virus n'a pas été possible chez 2 enfants sur 3, à partir de nouveaux prélèvements. L'existence d'une clairance du VIH 1 dans le cas d'enfants

infectés verticalement a été décrite ; il semblerait, dans ces deux cas, qu'il s'agisse de persistance virale silencieuse dans un organe cible. Par contre chez le troisième enfant, le réisolement a été possible ; aussi ce cas doit être considéré comme une infection asymptomatique avec absence d'anticorps spécifiques anti VIH 1, situation exceptionnelle déjà connue chez des sujets adultes (19).

Les techniques de culture des VIH trouvent tout leur intérêt dans le diagnostic de l'infection verticale chez les nouveau-nés, nés de mères séropositives. En effet comme nous l'avons vu précédemment, c'est une technique sensible et spécifique permettant de se prononcer généralement dans les trois premiers mois sur le statut de l'enfant. Elle ne peut toutefois suffire au suivi des enfants et doit être associée aux autres techniques décrites dans ce chapitre. Sa faisabilité et son coût en limitent considérablement son utilisation puisque peu de laboratoires possèdent l'équipement nécessaire.

3.4 DETECTION DU GENOME VIRAL PAR HYBRIDATION MOLECULAIRE

Le principe repose sur la mise en évidence du génome viral dans les cellules infectées par le virus du SIDA.

3.4.1 HYBRIDATION IN SITU

L'hybridation moléculaire permet de repérer dans un milieu complexe une séquence nucléique particulière (cible) sur un brin de génome. Le repérage de cette cible se fait grâce à la fixation d'une sonde, séquence nucléique complémentaire à la cible, formant ainsi un hybride. La sonde est marquée par un élément radioactif , permettant de détecter la présence après lavage de l'hybride (7).

Les sondes utilisées pour la recherche de l'ADN du VIH par hybridation in situ sont des sondes ARN marquées au soufre 35 (S35).

Chez les sujets infectés, un très petit nombre de lymphocytes expriment l'ARN du virus VIH. Aussi, cette technique est limitée par sa sensibilité, puisqu'elle ne détecte l'ARN viral que dans une cellule sur dix mille chez le sujet infecté (16).

3.4.2 AMPLIFICATION GENIQUE

La polymerase chain reaction ou PCR constitue la première technique d'amplification décrite et la plus largement utilisée, malgré l'apparition de nouvelles méthodes alternatives. Toutes ces techniques d'amplification ont pour but de produire à partir d'une séquence nucléique des quantités considérables de copies identiques, pouvant alors être facilement détectables par hybridation.

Polymerase chain reaction ou PCR

Son principe est basé sur la propriété de l'ADN polymérase, c'est à dire sa capacité de synthétiser un brin complémentaire d'un ADN simple brin. Cette synthèse a son point de départ au niveau d'une amorce, morceau d'acide nucléique de séquence complémentaire à celle du brin à amplifier. L'amorce ou primer est un oligonucléotide synthétique simple brin de 17 à 30 bases. L'association à l'ADN cible se poursuit par son élongation grâce à l'ADN polymérase qui puise dans le milieu réactionnel les bases nucléiques nécessaires. Il se forme ainsi un ADN double brin.

Après extraction de l'ADN viral du milieu biologique étudié, la PCR consiste classiquement en une succession de cycles constitués de trois étapes.

- Dénaturation thermique : en chauffant l'ADN double brin pendant une minute à température d'environ 94°C, les deux brins d'ADN se séparent.

- Hybridation des amorces : les deux amorces en large excès, chacune complémentaire d'un des brins, s'hybrident aux ADN simple brin. Pour cela le milieu réactionnel est amené à une température inférieure au T_m (melting temperature) des amorces, pendant environ une minute.

- Elongation des amorces : une ADN polymérase, la Taq polymérase généralement, allonge les amorces en y incorporant les nucléotides complémentaires de la séquence du brin auquel elles sont hybridées. La synthèse s'effectue dans le sens extrémité 5' vers extrémité 3' de l'ADN à la température optimale de 72°C pendant une à deux minutes.

A chaque cycle correspond le doublement de la séquence cible, le rendement étant toutefois inférieur à 100 %. Classiquement on effectue 25 à 40 cycles, générant en 2 à 4 heures un nombre considérable de copies (7).

La mise en évidence de l'ADN amplifié est réalisée après électrophorèse du mélange obtenu sur gel d' agar en présence de bromure d'éthyldium. Sous lumière ultra violet, on peut identifier l'ADN amplifié par sa migration

électrophorétique par rapport à un marqueur de poids moléculaire, ou bien on peut avoir recours à une simple hybridation.

Nested PCR

La nested PCR ou PCR "nichée" fait appel à une seconde phase d'amplification utilisant un deuxième couple d'amorces "internes" dont les séquences cibles sont situées sur les brins d'ADN synthétisés lors de la première amplification et en 3' des séquences reconnues par les amorces externes intervenant dans la première amplification (35). Cette technique dérivée de la PCR permettrait d'accroître la sensibilité de la PCR d'un facteur 100 (17).

ADN branché ou bDNA

Elle utilise la méthode appelée "arbre de Noël" qui a pour but d'augmenter le niveau du signal en multipliant la concentration des marqueurs (enzymes ou fluorochromes) fixés aux sondes. On utilise un support solide sur lequel est fixé une sonde. Cette première sonde est complémentaire d'une extrémité d'une deuxième sonde, capable de s'hybrider par son autre extrémité à l'ADN simple brin du prélèvement. Une troisième sonde composite est alors ajoutée au milieu, elle possède d'une part une séquence complémentaire de l'ADN lui permettant de s'y associer et d'autre part une séquence spécifique d'un amplificateur. Cet amplificateur est la structure branchée, comportant de multiples séquences identiques, complémentaires d'une dernière sonde marquée à la phosphatase alcaline. La présence du génome est révélée par un signal luminescent lors de l'addition du substrat de l'enzyme. Cette technique permet une quantification de la cible mais sa sensibilité reste inférieure à celle de la PCR en raison d'un bruit de fond plus élevé (7).

Pour les virus du SIDA, on amplifie des régions spécifiques des provirus VIH 1 et VIH 2 présents sous forme épisomale libre ou intégrée dans les chromosomes de la cellule hôte infectée. On utilise des amorces correspondant à des séquences géniques bien conservées dans différentes

zones LTR, gag, pol et env (16, 78). Cette notion de différentes zones est importante pour le diagnostic car la PCR peut être positive que pour un couple d'amorces (60).

Les techniques d'amplification génique permettent d'atteindre une très grande sensibilité par rapport à l'hybridation classique. En effet il est possible de multiplier par cent mille le nombre de copies d'ADN par cycles successifs (16). Ainsi la PCR est réalisée sur des échantillons sanguins de 0,5 à 1 millilitre et amplifie généralement l'ADN de 150.000 à 200.000 cellules mononuclées de sang périphérique. Cependant en cas de séquestration du virus dans un organe cible ou d'absence de réplication active, un si faible échantillon de sang périphérique pourrait ne contenir aucun lymphocyte infecté par le virus (75, 36, 61). Dans une étude menée à Brazzaville, sur 8 enfants infectés par le VIH 1, six échantillons sanguins périphériques prélevés à l'âge de un jour sur huit sont positifs par PCR (57). D'autres auteurs estiment qu'à la naissance ou dans la période néonatale (0 à 30 jours) la PCR, au même titre que la culture du virus, détecte seulement 50 % des enfants infectés (8, 75). Sa sensibilité s'améliore à 70 % dans les deux mois après la naissance et à plus de 90 % au delà (75).

La très grande amplification du matériel génique est responsable des problèmes de contamination ; aussi la manipulation de ces techniques doit être extrêmement rigoureuse. Plusieurs auteurs ont décrit des cas de PCR positives chez des enfants non infectés, très probablement dus à des contaminations (8, 27, 36, 19).

Ces techniques d'amplification génique présentent une sensibilité et une excellente spécificité dans de bonnes conditions de manipulation. De plus la rapidité de la technique permet d'obtenir le résultat en 48 heures, délai très court par rapport à la culture du virus (75).

La PCR et ses techniques apparentées, notamment celle de l'ADN branché qui semble avoir un intérêt particulier pour le suivi des sujets infectés, constituent des techniques de choix pour le diagnostic précoce de l'infection verticale à VIH, mais doivent être interprétées au vu des résultats des autres techniques de diagnostic (antigénémie p24 , culture virale, sérologies) et de la clinique.

3.5 PRODUCTION D'ANTICORPS IN VITRO

Les enfants infectés verticalement par le virus du SIDA devraient produire leurs propres anticorps contre le virus. Aussi les cellules mononucléées du sang périphérique de ces enfants, cultivées en présence de mitogènes, peuvent synthétiser des anticorps anti VIH, détectés dans le surnageant par ELISA ou par western-blot (60). Cette technique, de réalisation lourde, présente peu d'intérêt dans les deux premiers mois de vie, en raison d'un défaut de sensibilité (19). Il semblerait que celle-ci se situe entre celles de la culture / PCR et de l'antigénémie p24.

3.6 MARQUEURS NON SPECIFIQUES DE L'INFECTION

3.6.1 TAUX DES LYMPHOCYTES CD4 ET CD8

L'inversion du rapport des lymphocytes CD4 / CD8 associé à l'infection par le VIH chez les sujets adultes, apparaît également chez les enfants. Cependant la corrélation du taux de lymphocytes CD4 à l'évolution clinique est beaucoup moins évidente chez les enfants (60).

3.6.2 HYPERGAMMAGLOBULINEMIE

A la naissance les enfants présentent une hyper gammaglobulinémie physiologique aux alentours de 12 g/l. A partir de trois mois, le taux d'IgG redevient normal (3 à 5 g/l) pour les enfants non infectés par le VIH. En revanche, les taux de gammaglobulines des enfants infectés par le virus sont significativement plus élevés que ceux des enfants sains (74, 11).

3.6.3 β 2 MICROGLOBULINE ET NEOPTERINE

Les taux de β 2 microglobuline et de néoptérine, marqueurs de l'activation des lymphocytes et des macrophages, augmentent significativement dans le sérum des sujets adultes infectés par le virus du

SIDA. La croissance du taux de $\beta 2$ microglobuline a été aussi décrite comme un facteur prédictif de l'infection verticale par le VIH (60).

Le diagnostic de l'infection par le virus du SIDA chez les enfants nés de mères séropositives est actuellement peu standardisé et est réalisé par l'association de différentes techniques de diagnostic virologique, qui sont essentiellement la culture virale, l'amplification génique, l'antigénémie p24 et la sérologie par ELISA ou / et western-blot.



DEUXIEME

PARTIE



MATERIEL ET METHODE

Ce travail a pour but de démontrer l'aspect semi-quantitatif du test de dépistage Access HIV 1/2, en testant les prélèvements sanguins d'enfants nés de mères séropositives.

Avant d'effectuer les tests sur les prélèvements des enfants, il nous a semblé opportun de réaliser une étude préalable portant sur des prélèvements sanguins de sujets adultes.

1.1 ECHANTILLONS TESTES SUR LE SYSTEME ACCESS

Nous avons travaillé à partir de sérums et de plasmas issus de la sérothèque du Laboratoire de Virologie du CHU Purpan à Toulouse (Pr PUEL).

1.1.1 ETUDE PRÉLIMINAIRE

Sujets VIH séropositifs asymptomatiques

Nous avons également testé 100 sérums de sujets VIH séropositifs asymptomatiques issus de la sérothèque. Ils présentent tous une antigénémie p24 nulle après dissociation et un taux élevé d'anticorps p24 (supérieur à 100).

Sujets VIH séropositifs symptomatiques

Nous avons étudié une cohorte de 100 sérums provenant de patients VIH positifs symptomatiques (catégorie B et C de la classification de l'infection à VIH pour les adultes et les adolescents revue en 1993). Tous ces sérums présentent une antigénémie p24 supérieure à 120 et un taux d'anticorps p24 nul.

Sujets VIH séropositifs suivis pendant un an

Nous avons choisi 5 patients VIH séropositifs suivi pendant un an et dont les sérums (au total 29) montrent des taux d'anticorps p24 supérieurs à 200.

1.1.2 ETUDE DES PRÉLÈVEMENTS D'ENFANTS NÉS DE MÈRES SÉROPOSITIVES

Enfants nés de mères VIH séropositives

Nous avons retenu 42 enfants nés de mères infectées par le VIH 1. Au total, nous avons testé plus de 200 échantillons de sérum ou de plasma. Ces enfants sont nés entre 1986 et 1993 ; ils ont été choisis pour l'étude en fonction de leur statut infecté ou non et de la disponibilité des échantillons sanguins les concernant.

Pour tous ces enfants, le suivi virologique a été réalisé par l'antigénémie p24 après dissociation, le titrage de l'anticorps p24, la coculture et la PCR du virus de l'immunodéficience acquise ainsi que par les sérologies ELISA (Genelavia Pasteur ou Wellcome et Abbott 3ème génération) et le Western-blot (LAV-blot1 et LAV-blot2 Sanofi Diagnostics Pasteur).

Parmi les 42 enfants, 10 (enfants n°33 à 42) sont considérés comme infectés par le VIH, au vu de la positivité des cocultures et des PCR VIH obtenues dans les trois premiers mois de leur vie. De plus ces enfants ont présenté une symptomatologie variable en rapport avec la maladie (tableau 3) et les sérologies VIH ne sont jamais devenues négatives. La répartition sexuelle est la suivante : huit garçons et deux filles. Six d'entre eux sont d'origine européenne (enfants 33, 34, 35, 36, 37, 42), trois d'origine nord africaine (enfants 38, 40, 41), enfin un seul est originaire d'Afrique Noire (enfant 39).

Les enfants 41 et 42 sont décédés, le premier à l'âge de 6 ans (stade P2A dès la naissance) et le second dans sa première année.

Tableau 3

STADES CLINIQUES	ENFANTS
P1A	34, 39
P1B	37
P2A	33, 41, 42
P2C	35, 36, 40
P2D1	38

Au contraire, les trente deux autres enfants étaient non infectés par le VIH : les cultures, les PCR et les antigénémies réalisées ont été toujours négatives et les marqueurs sérologiques du VIH ont disparu dans un délai de 12 à 24 mois, en accord avec l'absence de symptômes évocateurs.

La répartition sexuelle est la suivante : quinze garçons et dix-sept filles. Dix-huit enfants sont d'origine européenne (enfants 3, 4, 5, 6, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 28, 29), quatre d'origine nord africaine (enfants 7, 22, 26, 27) et neuf originaires d'Afrique Noire (enfants 1, 2, 8, 9, 10, 11, 30, 31, 32).

Compte-tenu de l'intérêt de tels prélèvements, certains échantillons de la sérothèque étaient épuisés, ce qui explique que certains suivis sérologiques soient incomplets.

Pool de sérums séropositifs contenant des quantités croissantes de gammaglobulines

Cette manipulation supplémentaire a été conduite dans le but d'expliquer le profil sérologique de certains enfants dans les trois premiers mois de vie.

Nous avons réalisé des dilutions de gammaglobulines dans un pool de sérums VIH séropositifs.

Pour cela, des gammaglobulines commerciales à 50 g/l ont été diluées dans du sérum physiologique de façon à obtenir des solutions à différentes concentrations (2,5 g/l, 5 g/l, 7,5 g/l, 10 g/l, 15 g/l, 20 g/l). Nous avons ensuite mélangé à part égale chacune de ces solutions de gammaglobulines au pool de sérums VIH séropositifs.

De plus, le pool a été dilué au demi dans du sérum physiologique.

Pour chacune de ces dilutions ainsi obtenues, nous avons réalisé un dosage d'immunoglobulines G, A et M, ainsi qu'un test sérologique VIH sur le système Access.

1.2 SYSTEME D'IMMUNOANALYSE ACCESS

L'automate ACCESS de Sanofi Diagnostics Pasteur est un nouvel automate d'immunoanalyse multiparamétrique, déjà largement utilisé en chimie et en hormonologie et bientôt en infectiologie avec le nouveau test Access HIV1/2 et les prochains tests Access pour le VHC, le VHB, la rubéole, le CMV et la toxoplasmose.

Le test Access HIV 1/2 permet la détection des anticorps anti VIH 1 et anti VIH 2 par immunoenzymologie.

1.2.1 PRINCIPE DU TEST

Il utilise des particules paramagnétiques sensibilisées par la protéine A qui vont fixer les immunoglobulines du sérum testé. Le conjugué composé de 4 antigènes couplés à la phosphatase alcaline réagit uniquement avec les immunoglobulines spécifiques capturées, pendant la phase d'incubation (20 minutes). Après incubation et lavage, la réaction antigène-anticorps est révélée par un substrat chimioluminescent (un dioxétane) ; la lumière générée par l'hydrolyse enzymatique est mesurée par un luminomètre. Le résultat est obtenu en 30 minutes.

Les antigènes utilisés dans cette trousse de dépistage sont :

- une protéine recombinante p24
- deux peptides gp41
- un peptide gp36.

Les résultats sont exprimés en RLU et en ratio de la valeur du patient sur la valeur du témoin seuil (S/CO). Le seuil de positivité est de 1 en S/CO et l'intervalle de valeur douteuse préconisée par le constructeur est de 0,90 à 1,10.

Les dépistages sont rendus négatifs pour les valeurs de S/CO inférieures à 0,90, douteux pour les valeurs comprises entre 0,90 et 1,10 et positifs pour les valeurs supérieures à 1,10.

1.2.2 DESCRIPTION DU SYSTEME ACCESS

Ce système allie une facilité d'utilisation à une vitesse de rendu des résultats remarquable (30 minutes pour la sérologie VIH), liées à une automatisation totale.

En effet, l'intervention du technicien sur cet appareil se limite en routine au chargement des échantillons sur le carrousel et au remplacement des réactifs et autres consommables (cuvettes réactionnelles, tampon de lavage, sac poubelle), quand l'automate en signale la nécessité.

La connection avec un système informatique de laboratoire en bidirectionnel permet une identification des échantillons sur tube primaire par code à barre et limite considérablement les risques d'intervention de deux prélèvements et les erreurs de saisie informatique des résultats.

Les échantillons sont introduits dans le système, sur des portoirs de 10 emplacements, identifiés par un code à barre, qui sont chargés sur un carrousel pouvant contenir 6 portoirs, soit jusqu'à 60 prélèvements. La fonction ultrasonique de sonde de prélèvement principale assure la détection de niveau des échantillons (volume mort de 100 ul pour une prise de 15 ul), l'homogénéisation des microparticules magnétiques avant le prélèvement dans les packs réactifs et un lavage de qualité de la sonde, lors de sa décontamination.

Le concept des packs réactifs multidoses permet une gestion des réactifs par le logiciel du système Access : ces packs sont également identifiés par un code à barre. Les réactifs sont prêts à l'emploi dans ces packs recouverts par une membrane en élastomère, autoscellable après ponction par la sonde de distribution, ce qui évite l'évaporation et garantit leur stabilité lors du stockage dans le carrousel réactif réfrigéré à 4°C. Ainsi on peut disposer de 24 paramètres 24 heures sur 24 (24 packs de réactifs différents de 50 tests chacun).

Outre la gestion des réactifs et autres consommables, le logiciel du système Access offre différents modes de programmation des analyses : par patient ou par série, en routine ou en urgence. Il gère également les résultats des calibrations (une fois par mois) et des contrôles (recommandés pour chaque série ou au moins une fois par jour), tout en laissant à l'utilisateur la possibilité d'intervenir.

Les maintenances sont également très simples et entièrement automatiques : la maintenance journalière consiste en plusieurs cycles de lavage du système et se déroule en 30 minutes au maximum ; quant à la maintenance hebdomadaire, elle permet de contrôler l'efficacité des lavages et l'absence de phénomènes de contamination.

Pour notre étude, les échantillons ont été analysés sur des godets et leur identification a dû être réalisée manuellement. Nous avons utilisé un seul lot de réactif Access HIV 1/2 pour tester tous les échantillons. Les contrôles ont été passés avant chaque série (et ceci quelque soit sa taille) et les calibrations ont été réalisées en temps voulu. Nous avons respecté la fréquence des maintenances journalières et hebdomadaires et il n'est apparu aucun phénomène de contamination.

Tous les résultats, qui étaient rendus douteux ($0,90 < S/CO < 1,10$) ou ceux qui nous semblaient douteux en fonction du contexte clinique, ont été confirmés par une deuxième analyse sur le système Access.

RESULTATS

2.1 ETUDE PRÉLIMINAIRE

2.1.1 ETUDE DE SUJETS VIH-1 SEROPOSITIFS ASYMPTOMATIQUES ET SYMPTOMATIQUES

Pour chacune de ces deux séries de patients séropositifs, nous avons calculé la moyenne et l'écart-type des valeurs de S/CO obtenues avec le test Access HIV 1/2. Les résultats sont transcrits dans le tableau 6.

<u>Tableau 6</u>	Nombre de patients	Moyenne des valeurs S/CO	Ecart-type des valeurs S/CO
Patients séropositifs asymptomatiques	100	92,45	39,13
Patients séropositifs symptomatiques	100	63,88	32,28

Après avoir testé la normalité de ces deux échantillons, d'après le test de Student, il apparaît une différence significative entre les valeurs obtenues chez les sujets asymptomatiques et celles des sujets symptomatiques, au seuil de 1 %.

2.1.2 SUIVI DE CINQ SUJETS SEROPOSITIFS PENDANT UN AN

Pour chacun de ces patients, nous avons obtenu des valeurs de S/CO en technique Access HIV 1/2, reportée sur le tableau 7. Nous avons ainsi pu calculer individuellement la moyenne et l'écart-type de ces valeurs.

Tableau 7

	Patient A	Patient B	Patient C	Patient D	Patient E
	90,76	30,2	85,06	60,82	44,79
	86,86	26,37	126,92	77,66	38,85
	84,91	21,7	128,6	55,74	53,93
	66,91	23,71	112,56	61,94	67,39
	78,07	25,73	112,58	60,47	71,95
			76,47	64,43	87,87
			103,17		
Moyenne	81,502	25,542	106,48	63,51	60,796
Ecart type	9,416	3,183	19,797	7,488	18,362
Coefficient variabilité	11,5	12,5	18,5	11,8	30,2

Les écart-types obtenus pour ces cinq sujets sont peu importants, leur moyenne se situe à 11,6 et ils sont compris dans une fourchette de 3 à 20.

2.2 SUIVI DES ENFANTS NES DE MERES SEROPOSITIVES

Les résultats exprimés en S/CO, obtenus avec le kit Access HIV1/2 sont transcrits pour les 42 enfants de l'étude dans les tableaux 4 et 4 bis.

Pour chaque enfant, nous avons réalisé un tableau récapitulatif des examens biologiques qui ont été réalisés depuis la naissance à plus de 18 mois : culture virale, amplification génique, antigénémie p24, titrage de l'anticorps p24, dosage des immunoglobulines de type G, A et M, sérologies VIH et western-blot.

2.2.1 ENFANTS NON INFECTES (1 à 32)

Chez les enfants non infectés, la négativation de la sérologie par le kit Access HIV 1/2 survient à partir de 12 mois jusqu'à plus de 18 mois. Le test est négatif pour 5 enfants à 12 mois (enfants 1, 10, 14, 19 et 25), négatif pour l'enfant 27 et douteux pour les enfants 17 et 29 à 15 mois, négatif pour 10 enfants à 18 mois (enfants 2, 6, 8, 11, 12, 13, 15, 16, 26 et 31) et enfin négatif qu'au-delà de 18 mois pour l'enfant 5. Chez l'enfant 32, le test a montré un résultat encore douteux à l'âge de 2 ans.

Tableau 4 : résultats Access en S/CO des enfants non infectés

	N	1 M	2 M	3 M	6 M	9 M	12 M	15 M	18 M	>
enfant 1	54,25	50,13	37,93		2,17	1,23	0,48			
enfant 2	87,74	139,3		49,36	3,75				0,42	
enfant 3	90,74		74,29	105,1		9,89		1,34		
enfant 4	81,59	152,8	152,4		32,18		1,92			
enfant 5	102,1	185,1		211,5	82,75	56,18			2,52	0,56
enfant 6	200,4			212,5	110,3	21,92	2,10		0,46	
enfant 7	116,2	187,3		105,9		5,13				
enfant 8	131,5	163,3		180,5	67,75	20,93			0,73	
enfant 9		123,5	173,4	72,18	26,72		2,99			
enfant 10	175,6	210,8			31,77	2,71	0,77			0,63
enfant 11	67,35	126,5	94,07		36,84	11,43			0,79	
enfant 12	90,28	152,5		128,6	40,08		1,77		0,53	
enfant 13	168,7	321,6		360,9		6,66	2,60		0,78	
enfant 14	145,9	194,2			26,77		0,60		0,70	
enfant 15	96,29	134,8	202,9					1,38	0,61	
enfant 16	94,84	191,9		189,0		6,39		1,28	0,39	
enfant 17		130,5	187,8	184,9	119,2	28,18		1,06		
enfant 18	157,1	333,3		391,9			9,94			
enfant 19				94,57	36,31		0,78			
enfant 20						18,42		1,66		0,59
enfant 21	92,85					15,25	1,51			
enfant 22					135,7			1,96		
enfant 23					35,50	13,72	2,97			
enfant 24						12,11		1,31		
enfant 25				33,48			0,49			
enfant 26	149,2			71,72	24,08				0,47	
enfant 27		404,4				29,78		0,64		
enfant 28	191,1	243,6	207,0	18,28			1,34			
enfant 29	163,0	111,7				33,85		0,94		
enfant 30	63,0	99,20		128,0	13,88	1,00			0,44	
enfant 31	50,55	87,97	103,2			1,68		0,72		
enfant 32				117,7		22,66	6,22			1,14

Tableau 4 bis : résultats Access en S/CO des enfants infectés

	N	1 M	2 M	3 M	6 M	9 M	12 M	15 M	18 M	>
enfant 33				48,39			41,41			35,49
enfant 34	96,70	196,5		35,28						
enfant 35		275,8		258,3	51,91					
enfant 36	55,61		55,88	40,55	51,54	65,35	84,06			87,37
enfant 37				11,37	43,92	85,67	115,1	97,26	69,49	82,99
enfant 38	154,2				96,16	23,01	22,04	12,00	25,18	
enfant 39	45,17			22,91	32,80	59,68	68,89			87,00
enfant 40					37,06	34,73	18,34	16,24	26,23	9,99
enfant 41								18,26	60,78	50,56
enfant 42					8,46	1,61				

Il faut noter qu'en raison de l'épuisement des échantillons sériques, pour certains enfants, nous n'avons pu obtenir une quantité suffisante de sérum pour un suivi complet : ainsi pour 10 d'entre eux (enfants 3, 4, 7, 9, 18, 21, 22, 23, 24 et 28), nous n'avons pas de négativation du test, mais le suivi partiel montre tout de même une chute des anticorps spécifiques.

Les prélèvements de ces 32 enfants ont toujours été négatifs en culture et en PCR, sauf pour 3 d'entre eux (enfants 2, 7 et 16) où un résultat de PCR a été trouvé douteux sur un seul prélèvement : il s'agit probablement de phénomènes de contamination. L'antigénémie p24 est toujours restée négative pour tous ces sujets. Le suivi par western-blot, quand il a été réalisé de façon régulière, montre une disparition des différents anticorps spécifiques du virus au fil des mois.

Lorsque la sérologie par les techniques usuelles a été réalisée sur le même prélèvement que le test Access HIV 1/2, il apparaît une bonne corrélation entre les résultats obtenus dans les deux cas. En effet, les résultats négatifs de sérologie coïncident ; quant aux résultats douteux ou positifs, les valeurs de S/CO obtenues avec le test Access restent faibles en rapport avec les résultats douteux des autres techniques. De plus dans ce cas, le western-blot est toujours indéterminé avec la persistance d'une ou plusieurs bandes (gp160 chez les enfants 5 et 28 ; p24 pour l'enfant 17 ou encore gp160, p66, p31 et p24 pour l'enfant 20).

Dans la technique Access, chez 21 enfants sur 32, il apparaît une élévation du rapport S/CO dans les trois premiers mois de vie, suivie d'une décroissance vers la négativation du test. Parmi les 11 autres profils, seulement deux (enfants 1 et 29) ne présentent pas cette montée précoce du rapport S/CO, tandis que pour les 9 restants, le défaut d'échantillons ne permet pas d'en préjuger.

2.2.2 ENFANTS INFECTES (33 à 42)

Chez ces 10 enfants, nous n'observons pas de chute du rapport S/CO vers une négativation du test Access en raison de leur statut. Pour l'enfant 42, le dernier prélèvement à 9 mois montre une valeur de S/CO particulièrement basse, qui est en rapport avec son état clinique puisque cet enfant décédera quelques mois plus tard.

<u>Tableau</u> <u>5</u>	Nombre d'enfants non infectés	Valeurs des S/CO	Nombre d'enfants infectés	Valeurs des S/CO
3 MOIS	20	37,93 / 49,36 / 105,1 / 211,5 / 212,5 / 105,9 / 180,5 / 72,18 / 128,6 / 360,9 / 189,0 / 184,9 / 391,9 / 94,57 / 33,48 / 71,72 / 207,0 / 128,0 / 103,2 / 117,7	6	48,39 / 35,28 / 258,3 / 40,55 / 11,37 / 22,91
6 MOIS	17	2,17 / 3,75 / 82,75 / 110,3 / 67,75 / 26,72 / 31,77 / 36,84 / 40,08 / 26,77 / 119,2 / 36,61 / 135,7 / 35,50 / 24,08 / 18,28 / 13,88	7	51,91 / 51,54 / 43,92 / 96,16 / 32,80 / 37,06 / 8,46
9 MOIS	20	1,23 / 9,89 / 32,18 / 56,18 / 21,92 / 5,13 / 20,93 / 2,71 / 11,43 / 6,66 / 6,39 / 28,18 / 18,42 / 15,25 / 13,72 / 12,11 / 29,78 / 33,85 / 1,00 / 22,66	6	65,35 / 85,67 / 23,01 / 59,68 / 34,73 / 1,61
12 MOIS	15	0,48 / 1,92 / 2,10 / 2,99 / 0,77 / 1,77 / 2,60 / 0,60 / 9,94 / 0,78 / 1,51 / 2,97 / 0,49 / 1,68 / 6,22	6	41,41 / 84,06 / 115,1 / 22,04 / 68,89 / 18,34

Dans le cas des autres sujets, il existe une diminution des valeurs du rapport S/CO au cours des mois jusqu'à l'âge de 3 à 12 mois, suivie d'une stabilisation fragile dans une intervalle de valeurs de 20 à 80 environ selon les enfants.

La culture virale et la PCR ont été réalisées que chez cinq enfants. Elles se sont avérées négatives à la naissance pour les enfants 34, 36, 38 et 39 et à 7 jours pour l'enfant 37. A l'âge de 1 mois, la culture et la PCR étaient positives pour les enfants 34 et 37, et à l'âge de 3 mois et 9 mois respectivement pour les enfants 38 et 39.

2.2.3 COMPARAISON DES VALEURS DE S/CO OBTENUES ENTRE ENFANTS INFECTES ET NON INFECTES

Nous nous proposons de comparer les valeurs de S/CO obtenues avec le test Access HIV 1/2 entre les enfants infectés et entre les enfants non infectés à l'âge de 3 mois, de 6 mois, de 9 mois et de 12 mois, pour savoir à quel moment il existe une différence significative ou non en fonction du statut infecté ou non par le VIH.

Pour cela, nous utiliserons un test statistique non paramétrique : le test de Mann et Withney (tableau 5).

A l'âge de 3 mois, la différence est significative entre les enfants infectés et les enfants non infectés au seuil de 5%, mais est non significative au seuil de 1%. De même à 6 mois, elle est non significative aux seuils de 5% et de 1%, et à 9 mois, elle est significative au seuil de 5% mais non significative au seuil de 1%.

En revanche, à l'âge de 12 mois, il existe une différence significative au seuil de 1%.

2.2.4 DILUTION DE GAMMAGLOBULINES DANS UN POOL DE SERUMS VIH POSITIFS

Devant l'augmentation des valeurs de S/CO dans les trois premiers mois de vie d'un certain nombre d'enfants, sans autre explication que le principe même du test, c'est à dire une phase d'immunocapture des immunoglobulines totales, nous avons testé l'influence du taux de gammaglobulines polyvalentes sur les résultats de ce test.

Pour chaque dilution de gammaglobulines, nous avons effectué un dosage pondéral des Ig G et un test Access HIV 1/2, dont les résultats sont reporté dans le tableau 8.

Tableau 8

Ig G en g/l	4,93	6,49	7,08	8,97	9,93	12,1	15,2	20,6
S/CO	105,6	77,76	66,59	57,13	50,93	40,17	30,70	24,88

Il apparait clairement une diminution du quotient S/CO en rapport avec une augmentation de la concentration des Ig G totales (figure 6).

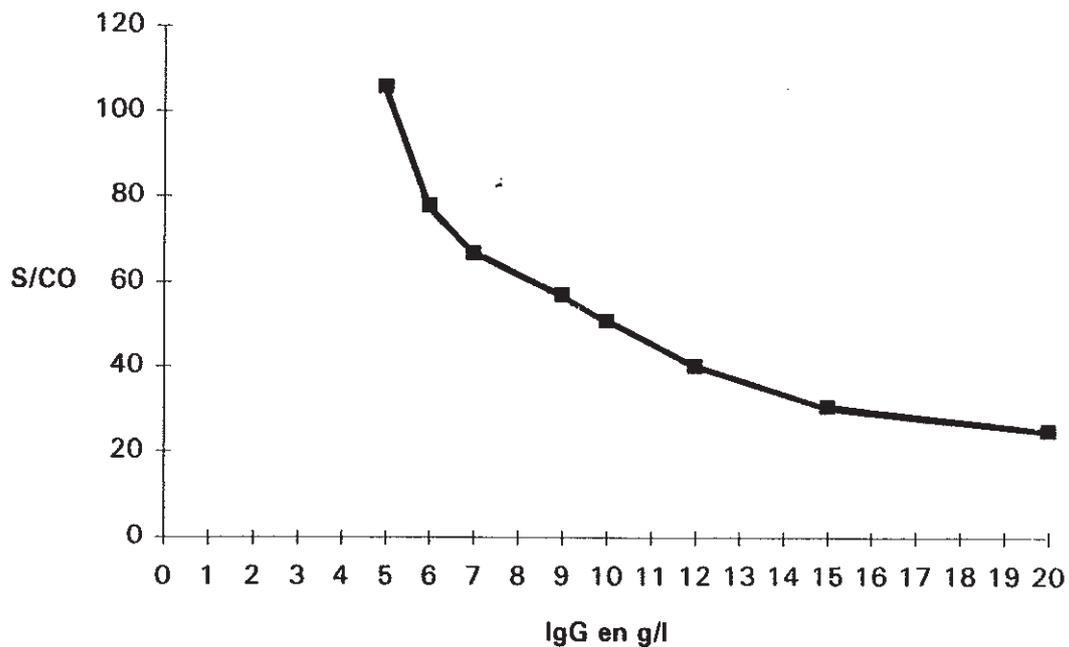


Figure 6 : Influence de la concentration en Ig G sur le rapport S/CO.

ENFANT 2	N	15 J	1 M	2 M	3 M	6 M	9 M	12 M	15 M	18 M	>
RESULTAT ACCESS (S/CO)	87,74		139,3		49,36	3,75				neg 0,42	
COCULTURE	-		-		-	-		-			
PCR ADN VIH	pol+/- gag+ -		-		-	-		-			
ANTIGENEMIE P24	0				0	0		0			
ANTICORPS P24					13			0			
IMMUNOGLOBULINES G	15,9				6,91	11,1					
IMMUNOGLOBULINES A	<0,07				0,41	0,67					
IMMUNOGLOBULINES M	0,09				1,12	2,66					
SEROLOGIES VIH											
1ère TECHNIQUE	+				+	+				-	
2ème TECHNIQUE	+				+	+				-	
WESTERN-BLOT 1											
gp160	+				+					-	
gp120	+				+					-	
p66	+				+					-	
p55	+				+/-					-	
p51	+				+					-	
gp41	+				+/-					-	
p31	+				+					-	
p24	+				+					+	
p17	+				-					-	
WESTERN-BLOT 2											
gp140	-				-						
gp105	-				-						
p68	-				-						
p56	-				-						
gp36	-				-						
P26	+				+						
p16	+/-				-						

ENFANT 3	N	15 J	1 M	2 M	3 M	6 M	9 M	12 M	15 M	18 M	>
RESULTAT ACCESS (S/CO)	90,74			74,29	105,1		9,89		1,34		
COCULTURE	-			-							
PCR ADN VIH				-							
ANTIGENEMIE P24	0			0	0	0	0		0		0
ANTICORPS P24	256			32	32	1	1		0		0
IMMUNOGLOBULINES G	13,5				5,19		5,8				
IMMUNOGLOBULINES A	<0,07				0,14		0,16				
IMMUNOGLOBULINES M	0,11				0,80		1,19				
SEROLOGIES VIH											
1ère TECHNIQUE				+		+	+				-
2ème TECHNIQUE				+		+	+				-
WESTERN-BLOT 1											
gp160	+			+	+	+	+				
gp120	+			+	+	+	+				
p66	+			+	+	+/-	+/-				
p55	+			+	+	+	+				
p51	+			+	+	+/-	+/-				
gp41	+			+	+	+	+				
p31	+			+	+	+	+				
p24	+			+	+	+	+				
p17	+			+	+	+/-	+/-				
WESTERN-BLOT 2											
gp140				-		-	-				
gp105				-		-	-				
p68				-		-	-				
p56				-		-	-				
gp36				-		-	-				
P26				+		+	+				
p16				-		-	-				

ENFANT 5	N	15 J	1 M	2 M	3 M	6 M	9 M	12 M	15 M	18 M	>
RESULTAT ACCESS (S/CO)	102,1		185,1								neg 0,56
COCULTURE	-		-		-	-	-			-	
PCR ADN VIH	-		-		-	-	-			-	
ANTIGENEMIE P24	0		0		0	0	0			0	
ANTICORPS P24	0		0		0	0	0				
IMMUNOGLOBULINES G	15,2						4,87				
IMMUNOGLOBULINES A	<0,07						0,08				
IMMUNOGLOBULINES M	0,12						0,45				
SEROLOGIES VIH											
1ère TECHNIQUE	+		+			+	+			+	-
2ème TECHNIQUE	+		+			+	+			-	-
WESTERN-BLOT 1											
gp160	+		+		+	+	+			+	-
gp120	+		+		+	+	+			-	-
p66	+		+		+	+	+			-	-
p55	+		+		+	+	-			-	-
p51	+		+		+	+	+/-			-	-
gp41	+		+		+	+	+			-	-
p31	+		+		+	+	+			-	-
p24	+/-		+/-		+/-	+/-	-			-	-
p17	+/-		+/-		+/-	+/-	-			-	-
WESTERN-BLOT 2											
gp140	-		-		-	-	-				
gp105	-		-		-	-	-				
p68	-		-		-	-	-				
p56	-		-		-	-	-				
gp36	-		-		-	-	-				
P26	-		-		-	-	-				
p16	-		-		-	-	-				

ENFANT 8	N	15 J	1 M	2 M	3 M	6 M	9 M	12 M	15 M	18 M	>
RESULTAT ACCESS (S/CO)	131,5		163,3		180,5	67,75	20,93			neg 0,73	
COCULTURE	-		-		-	-	-			-	
PCR ADN VIH	-		-		-	-	-			-	
ANTIGENEMIE P24	0		0		0		0	0		0	
ANTICORPS P24	256		128		256		128	32		0	
IMMUNOGLOBULINES G	16,7				4,88	7,31	8,43			10,2	
IMMUNOGLOBULINES A	<0,07				0,12	0,25	0,48			0,79	
IMMUNOGLOBULINES M	0,05				0,33	0,64	1			1,57	
SEROLOGIES VIH											
1ère TECHNIQUE	+							+		-	
2ème TECHNIQUE	+							-		-	
WESTERN-BLOT 1											
gp160	+		+				+	+		-	
gp120	+		+				+/-	-		-	
p66	+		+				+	-		-	
p55	+		+				+	+		-	
p51	+		+				+/-	+/-		-	
gp41	+		+				-	+		-	
p31	+		+				+/-	+/-		-	
p24	+		+				+	+		-	
p17	+		+				-	+/-		-	
WESTERN-BLOT 2											
gp140	-		-				-	-			
gp105	-		-				-	-			
p68	+		+				-	+/-			
p56	+		+/-				-	-			
gp36	+		+				-	-			
P26	+		+				+	+			
p16	-		-				-	-			

ENFANT 9	N	15 J	1 M	2 M	3 M	6 M	9 M	12 M	15 M	18 M	>
RESULTAT ACCESS (S/CO)			123,5	173,4	72,18	26,72		2,99			
COCULTURE			-		-	-					
PCR ADN VIH				-	-	-					
ANTIGENEMIE P24			0		0	0		0			
ANTICORPS P24			0		1	1		0			
IMMUNOGLOBULINES G			8,12				5,18				
IMMUNOGLOBULINES A			0,10				0,18				
IMMUNOGLOBULINES M			0,32				0,77				
SEROLOGIES VIH			+		+						
1ère TECHNIQUE			+		+						
2ème TECHNIQUE											
WESTERN-BLOT 1											
gp160			+		+	+		+			
gp120			+		+	+		-			
p66			+		+	+/-		-			
p55			+		+	+		+/-			
p51			+		+	+/-		-			
gp41			+		+	+		-			
p31			+		+	+		+/-			
p24			+		+	+		+			
p17			+		+	+/-		+/-			
WESTERN-BLOT 2											
gp140			-		-			-			
gp105			-		-			-			
p68			-		-			-			
p56			-		-			-			
gp36			-		-			-			
P26			+		+			-			
p16			-		-			-			

ENFANT 10	N	15 J	1 M	2 M	3 M	6 M	9 M	12 M	15 M	18 M	>
RESULTAT ACCESS (S/CO)	175,6		210,8			31,77	2,71	neg 0,77			neg 0,63
COCULTURE	-		-			-	-				
PCR ADN VIH	-		-			-	-				
ANTIGENEMIE P24	0		0			0	0	0			0
ANTICORPS P24	64					8	1	0			0
IMMUNOGLOBULINES G	14,7		5,35			6,41	11,4				
IMMUNOGLOBULINES A	<0,07		<0,07			0,56	0,56				
IMMUNOGLOBULINES M	0,10		0,25			0,62	1,03				
SEROLOGIES VIH											
1ère TECHNIQUE	+							-			-
2ème TECHNIQUE	+							-			-
WESTERN-BLOT 1											
gp160	+					+	-	-			
gp120	+					+/-	-	-			
p66	+					+	-	-			
p55	+					+	+/-	+			
p51	+					-	-	-			
gp41	+					+/-	-	-			
p31	+					+/-	-	-			
p24	+					+	+/-	+			
p17	+					+/-	-	-			
WESTERN-BLOT 2											
gp140	-					-	-	-			
gp105	-					-	-	-			
p68	-					-	-	-			
p56	-					-	-	-			
gp36	-					-	-	-			
P26	+					+	+/-	+/-			
p16	-					-	-	-			

ENFANT 11	N	4 J	1 M	2 M	3 M	6 M	9 M	12 M	15 M	18 M	>
RESULTAT ACCESS (S/CO)	67,35	99,59	126,5	94,07		36,84	11,43			neg 0,79	
COCULTURE		-	-	-		-					
PCR ADN VIH		-	-	-		-					
ANTIGENEMIE P24	0		0	0		0	0			0	
ANTICORPS P24			256	>250		50	25				
IMMUNOGLOBULINES G	23,5									8,75	
IMMUNOGLOBULINES A	<0,07									0,63	
IMMUNOGLOBULINES M	0,13									1,08	
SEROLOGIES VIH											
1ère TECHNIQUE	+			+			+			-	
2ème TECHNIQUE	+			+			+			-	
WESTERN-BLOT 1											
gp160	+			+			+			-	
gp120	+			+			+/-			-	
p66	+			+			+			-	
p55	+			+			+/-			-	
p51	+			+			+			-	
gp41	+			+			+/-			-	
p31	+			+			+			+/-	
p24	+			+			+			+	
p17	+			+			+			-	
WESTERN-BLOT 2											
gp140	-			-							
gp105	-			-							
p68	+			+/-							
p56	+			+							
gp36	+			+							
P26	+			+							
p16	-			-							

ENFANT 12	N	15 J	1 M	2 M	3 M	6 M	9 M	12 M	15 M	18 M	>
RESULTAT ACCESS (S/CO)	90,28		152,5		128,6	40,08		1,77		0,53	
COCULTURE	-		-			-		-		-	
PCR ADN VIH	-					-		-		-	
ANTIGENEMIE P24	0		0		0	0	0	0		0	
ANTICORPS P24	0		0		0	0	0	0		0	
IMMUNOGLOBULINES G	13,7		4,28		2,21		4,26				
IMMUNOGLOBULINES A	<0,07		0,08		<0,07		0,19				
IMMUNOGLOBULINES M	0,09		0,36		0,27		0,59				
SEROLOGIES VIH											
1ère TECHNIQUE	+						+			-	
2ème TECHNIQUE	+						+			-	
WESTERN-BLOT 1											
gp160	+		+		+		+			-	
gp120	+		+		+		+/-			-	
p66	+		+		+/-		-			-	
p55	+/-		-		+/-		-			-	
p51	-		-		+/-		-			-	
gp41	+		+/-		-		-			-	
p31	+		+		+		+/-			-	
p24	+		+/-		-		-			-	
p17	-		-		-		-			-	
WESTERN-BLOT 2											
gp140	-		-		-		-			-	
gp105	-		-		-		-			-	
p68	-		-		-		-			-	
p56	-		-		-		-			-	
gp36	+/-		+/-		-		-			-	
P26	-		-		-		-			-	
p16	-		-		-		-			-	

ENFANT 13	N	7 J	1 M	2 M	3 M	6 M	9 M	12 M	15 M	18 M	>
RESULTAT ACCESS (S/CO)	168,7	185,8	321,6		360,9		6,66	2,60		neg 0,78	
COCULTURE		-	-		-					-	
PCR ADN VIH		-	-		-					-	
ANTIGENEMIE P24	0		0		0		0	0		0	
ANTICORPS P24	256		256		256		2	1		0	
IMMUNOGLOBULINES G	8,74		3,32		1,8		3,65				
IMMUNOGLOBULINES A	<0,07		0,08		0,09		0,12				
IMMUNOGLOBULINES M	0,28		0,36		0,53		0,82				
SEROLOGIES VIH 1ère TECHNIQUE 2ème TECHNIQUE	+									-	
	+									-	
WESTERN-BLOT 1											
gp160	+		+		+		+			-	
gp120	+		+		+		-			-	
p66	+		+		+		+/-			-	
p55	+		+		+/-		+/-			-	
p51	+		+		+		-			-	
gp41	+		+		+		-			-	
p31	+		+		+		-			-	
p24	+		+		+		+			-	
p17	+		+		+		-			-	
WESTERN-BLOT 2											
gp140	-						-			-	
gp105	-						-			-	
p68	-						-			-	
p56	-						-			-	
gp36	-						-			-	
P26	+						+/-			-	
p16	-						-			-	

ENFANT 14	N	15 J	1 M	2 M	3 M	6 M	9 M	12 M	15 M	18 M	>
RESULTAT ACCESS (S/CO)	145,9		194,2			26,77		neg 0,60		neg 0,70	
COCULTURE	-					-			-		
PCR ADN VIH	-					-			-		
ANTIGENEMIE P24	0		0			0				0	
ANTICORPS P24			256			8		0		0	
IMMUNOGLOBULINES G	12		5,3			4,42				6,5	
IMMUNOGLOBULINES A	<0,07		<0,07			0,17				0,24	
IMMUNOGLOBULINES M	0,12		0,27			0,67				1,24	
SEROLOGIES VIH											
1ère TECHNIQUE			+								
2ème TECHNIQUE			+								
WESTERN-BLOT 1											
gp160	+		+			+					
gp120	+		+			+					
p66	+		+			+/-					
p55	+		+			-					
p51	+		+			-					
gp41	+		+			-					
p31	+		+			-					
p24	+		+			+					
p17	+		+			+					
WESTERN-BLOT 2											
gp140	-					-					
gp105	-					-					
p68	-					-					
p56	-					-					
gp36	+					-					
P26	+					+					
p16	-					-					

ENFANT 15	N	15 J	1 M	2 M	3 M	6 M	9 M	12 M	15 M	18 M	>
RESULTAT ACCESS (S/CO)	96,29		134,8	202,9					1,38	neg 0,61	
COCULTURE	-		-	-			-				
PCR ADN VIH	-		-	-			-				
ANTIGENEMIE P24	0		0	0		0			0	0	
ANTICORPS P24			16	16					0		
IMMUNOGLOBULINES G											
IMMUNOGLOBULINES A											
IMMUNOGLOBULINES M											
SEROLOGIES VIH											
1ère TECHNIQUE			+	+			+		+/-	-	
2ème TECHNIQUE			+	+			+		+	-	
WESTERN-BLOT 1											
gp160			+	+			+				
gp120			+	+			+				
p66			+	+			+				
p55			+	+			+/-				
p51			+	+			+/-				
gp41			+	+			+/-				
p31			+	+			+				
p24			+	+			+				
p17			+	+			-				
WESTERN-BLOT 2											
gp140			-	-							
gp105			-	-							
p68			+	+/-							
p56			-	-							
gp36			+	+							
P26			+	+							
p16			-	-							

ENFANT 18	N	15 J	1 M	2 M	3 M	6 M	9 M	12 M	15 M	18 M	>
RESULTAT ACCESS (S/CO)	157,1		333,3		391,9			9,94			
COCULTURE	-		-		-			-			
PCR ADN VIH	-		-		-			-			
ANTIGENEMIE P24	0		0		0	0		0			0
ANTICORPS P24	256		256		64	2		0			0
IMMUNOGLOBULINES G											
IMMUNOGLOBULINES A											
IMMUNOGLOBULINES M											
SEROLOGIES VIH											
1ère TECHNIQUE	+		+								-
2ème TECHNIQUE	+		+								-
WESTERN-BLOT 1											
gp160	+		+		+	+					
gp120	+		+		+	+					
p66	+		+		+	+					
p55	+		+		+	+					
p51	+		+		+	+					
gp41	+		+		+	+					
p31	+		+		+	+					
p24	+		+		+	+					
p17	+		+		+	+/-					
WESTERN-BLOT 2											
gp140	-		-		-	-					
gp105	-		-		-	-					
p68	-		-		-	-					
p56	-		-		-	-					
gp36	+/-		+/-		-	-					
p26	+		+		+	+					
p16	-		-		-	-					

ENFANT 20	N	15 J	1 M	2 M	3 M	6 M	9 M	12 M	15 M	18 M	>
RESULTAT ACCESS (S/CO)							18,42		1,66		neg 0,59
COCULTURE									-		-
PCR ADN VIH									-		-
ANTIGENEMIE P24							0		0		0
ANTICORPS P24							2		0		
IMMUNOGLOBULINES G											
IMMUNOGLOBULINES A											
IMMUNOGLOBULINES M											
SEROLOGIES VIH											
1ère TECHNIQUE							+		-		-
2ème TECHNIQUE							+		+/-		-
WESTERN-BLOT 1											
gp160							+		+		
gp120							+		-		
p66							+/-		+/-		
p55							+/-		-		
p51							-		-		
gp41							+/-		-		
p31							+/-		+/-		
p24							+		+		
p17							+		-		
WESTERN-BLOT 2											
gp140							-		-		
gp105							-		-		
p68							-		-		
p56							-		-		
gp36							-		-		
p26							+		-		
p16							-		-		

ENFANT 22	N	15 J	1 M	2 M	3 M	6 M	9 M	12 M	15 M	18 M	>
RESULTAT ACCESS (S/CO)						135,7			1,96		
COCULTURE					-	-					
PCR ADN VIH					-	-					
ANTIGENEMIE P24									0		
ANTICORPS P24									1		
IMMUNOGLOBULINES G											
IMMUNOGLOBULINES A											
IMMUNOGLOBULINES M											
SEROLOGIES VIH											
1ère TECHNIQUE									+		
2ème TECHNIQUE									+		
WESTERN-BLOT 1											
gp160									+/-		
gp120									-		
p66									-		
p55									-		
p51									-		
gp41									-		
p31									+/-		
p24									+/-		
p17									-		
WESTERN-BLOT 2											
gp140									-		
gp105									-		
p68									-		
p56									-		
gp36									-		
p26									+		
p16									-		

ENFANT 24	N	15 J	1 M	2 M	3 M	6 M	9 M	12 M	15 M	18 M	>
RESULTAT ACCESS (S/CO)							12,11		1,31		
COCULTURE							-		-		
PCR ADN VIH							-		-		
ANTIGENEMIE P24							0		0		
ANTICORPS P24							4		0		
IMMUNOGLOBULINES G											
IMMUNOGLOBULINES A											
IMMUNOGLOBULINES M											
SEROLOGIES VIH											
1ère TECHNIQUE							+				-
2ème TECHNIQUE							+				-
WESTERN-BLOT 1											
gp160							+				
gp120							-				
p66							-				
p55							+/-				
p51							-				
gp41							-				
p31							-				
p24							+				
p17							-				
WESTERN-BLOT 2											
gp140							-				
gp105							-				
p68							-				
p56							-				
gp36							-				
p26							+/-				
p16							-				

ENFANT 25	N	15 J	1 M	2 M	3 M	4 M	6 M	9 M	12 M	15 M	18 M	>
RESULTAT ACCESS (S/CO)					33,48	17,79			0,49			
COCULTURE					-	-			-			
PCR ADN VIH					-	-			-			
ANTIGENEMIE P24					0	0			0			
ANTICORPS P24					8	0			0			
IMMUNOGLOBULINES G					9,25	6,67						
IMMUNOGLOBULINES A					0,74	0,21						
IMMUNOGLOBULINES M					0,43	0,47						
SEROLOGIES VIH					+			+	-			
1ère TECHNIQUE					+			+	-			
2ème TECHNIQUE												
WESTERN-BLOT 1												
gp160					+	+				-		
gp120					+	+				-		
p66					+	+/-				+/-		
p55					+/-	-				-		
p51					+	+/-				-		
gp41					+	+				-		
p31					-	-				-		
p24					+	+				-		
p17					+	+/-				-		
WESTERN-BLOT 2												
gp140					-					-		
gp105					-					-		
p68					-					+/-		
p56					-					-		
gp36					-					-		
p26					+/-					-		
p16					-					-		

ENFANT 26	N	15 J	1 M	2 M	3 M	6 M	9 M	12 M	15 M	18 M	>
RESULTAT ACCESS (S/CO)	149,2				71,72	24,08				neg 0,47	
COCULTURE	-		-		-					-	
PCR ADN VIH	-		-		-					-	
ANTIGENEMIE P24	0		0		0	0		0		0	
ANTICORPS P24					32						
IMMUNOGLOBULINES G	14,4				4,02						
IMMUNOGLOBULINES A	<0,07				0,17						
IMMUNOGLOBULINES M	0,26				0,74						
SEROLOGIES VIH											
1ère TECHNIQUE	+		+			+		-		-	
2ème TECHNIQUE	+		+			+		-		-	
WESTERN-BLOT 1											
gp160	+		+		+			-			
gp120	+		+		+			-			
p66	+		+		+			-			
p55	+		+		+			-			
p51	+		+		+			-			
gp41	+		+		+			-			
p31	+		+		+			-			
p24	+		+		+			+/-			
p17	+/-		+		+/-			+/-			
WESTERN-BLOT 2											
gp140	-		-		-						
gp105	-		-		-						
p68	-		-		-						
p56	-		-		-						
gp36	-		-		-						
p26	+		+		+						
p16	-		-		-						

ENFANT 28	N	15 J	1 M	2 M	3 M	6 M	9 M	12 M	15 M	18 M	>
RESULTAT ACCESS (S/CO)	191,1		243,6		207	18,28			1,34		
COCULTURE	-		-		-						
PCR ADN VIH	-		-		-						
ANTIGENEMIE P24	0		0		0	0			0		
ANTICORPS P24	256		256		64				0		
IMMUNOGLOBULINES G	7,83		7,83	4,08	3,11		4,08				
IMMUNOGLOBULINES A	0,03		0,03	0,14	0,08		0,14				
IMMUNOGLOBULINES M	0,08		0,08	0,60	0,34		0,60				
SEROLOGIES VIH	+				+	+			+		-
1ère TECHNIQUE	+				+	+			+/-		-
2ème TECHNIQUE											
WESTERN-BLOT 1											
gp160	+		+		+	+			+/-		-
gp120	+		+		+	+			-		-
p66	+		+		+	+			-		-
p55	+		+		+	+			-		-
p51	+		+		+	+			-		-
gp41	+		+		+	+/-			-		-
p31	+		+		+	+			-		-
p24	+		+		+	+			-		-
p17	+		+		-	-			-		-
WESTERN-BLOT 2											
gp140	-		-		-	-			-		
gp105	-		-		-	-			-		
p68	-		-		-	-			-		
p56	-		-		-	-			-		
gp36	+/-		+/-		-	-			-		
p26	+		+		+	+/-			-		
p16	-		-		-	-			-		

ENFANT 30	N	15 J	1 M	2 M	3 M	6 M	9 M	12 M	15 M	18 M	>
RESULTAT ACCESS (S/CO)	63,0		99,20		128,0	13,88	dtx 1,00			neg 0,44	
COCULTURE	-		-		-	-	-			-	
PCR ADN VIH	-		-		-	-	-			-	
ANTIGENEMIE P24	0		0		0	0	0	0		0	
ANTICORPS P24	64		16		16	0	0	0		0	
IMMUNOGLOBULINES G	16,5		7,89		4,6	8,81					
IMMUNOGLOBULINES A	<0,07		0,08		<0,07	0,41					
IMMUNOGLOBULINES M	0,11		0,49		0,92	1,25					
SEROLOGIES VIH											
1ère TECHNIQUE					+					-	
2ème TECHNIQUE					+					-	
WESTERN-BLOT 1											
gp160	+		+		+	+	+	-		-	
gp120	+		+		+	+	-	-		-	
p66	+		+		+	+	+	+/-		+/-	
p55	+		+		+	+	+	-		-	
p51	+		+		+	+	+	+/-		+/-	
gp41	+		+		+	+	-	+/-		+/-	
p31	+		+		+	+	+	+/-		+/-	
p24	+		+		+	+	+	+/-		+/-	
p17	+/-		+/-		+/-	+/-	-	-		-	
WESTERN-BLOT 2											
gp140			-		-	-	-	-		-	
gp105			-		-	-	-	-		-	
p68			+		+/-	-	-	-		-	
p56			+/-		-	-	-	-		-	
gp36			+/-		-	-	-	-		-	
p26			+		+	+/-	-	-		-	
p16			-		-	-	-	-		-	

ENFANT 31	N	15 J	1 M	2 M	3 M	6 M	9 M	12 M	15 M	18 M	>
RESULTAT ACCESS (S/CO)	50,55		87,97	103,2				1,68		neg 0,72	
COCULTURE	-						-	-			
PCR ADN VIH							-	-			
ANTIGENEMIE P24	0		0	0	0	0	0	0		0	0
ANTICORPS P24	16		8	2	1	1	0	0		0	0
IMMUNOGLOBULINES G	14		7,26	3,73			6,38	8,26		8,65	
IMMUNOGLOBULINES A	<0,07		0,12	<0,07			0,60	0,84		1,01	
IMMUNOGLOBULINES M	0,08		0,40	0,72			1,18	1,42		1,36	
SEROLOGIES VIH											
1ère TECHNIQUE	+		+								
2ème TECHNIQUE	+		+								
WESTERN-BLOT 1											
gp160	+		+	+	+	+	+	+/-		-	-
gp120	+		+	+	+	+	+	-		-	-
p66	+		+	+	+/-	+/-	+/-	-		-	-
p55	+		+	+	+	+	-	+/-		-	-
p51	+		+	+	+/-	+/-	-	-		-	-
gp41	+		+	+	+	+	-	-		-	-
p31	+		+	+	+	+	+/-	+/-		-	-
p24	+		+	+	+	+	+	+		+/-	-
p17	+		+	+	+	+/-	-	-		-	-
WESTERN-BLOT 2											
gp140								-		-	-
gp105								-		-	-
p68								-		-	-
p56								-		-	-
gp36								-		-	-
p26								-		-	-
p16								-		-	-

DISCUSSION

La transmission périnatale du virus du SIDA de la mère à l'enfant pose, nous l'avons vu, un véritable problème pour le diagnostic précoce.

Le diagnostic positif d'infection par le virus est généralement réalisé dans les trois premiers mois dans le cas d'enfants régulièrement suivis grâce aux techniques de diagnostic direct, comme la culture virale et la PCR, avec une bonne sensibilité et une bonne spécificité. Cependant dans le cas des enfants non infectés, le diagnostic de non infection ne peut être confirmé que lors de la négativation de la sérologie, en l'absence de signes cliniques évocateurs d'un SIDA.

Dans notre étude, il apparaît clairement que le test Access HIV 1/2, grâce au système de révélation de la technique immunoenzymatique, peut être considéré comme un test sérologique semi-quantitatif. En effet, le suivi d'enfants non infectés peut être assimilé à l'étude de panels de dilutions naturelles d'anticorps VIH spécifiques. D'autre part, nous avons montré que chez des sujets adultes asymptomatiques VIH séropositifs, les variations des S/CO obtenues sur des prélèvements d'une année sont peu importantes, ce qui est en rapport avec leur statut clinique. Le nombre de sujets étudiés est certes très faible ($n=5$) mais la démarche nous semblait intéressante pour l'exploitation de nos résultats.

L'étude des sérums tardifs (18 mois et plus) d'enfants non infectés a donné une approche de la sensibilité de cette technique. Deux enfants sont effectivement toujours séropositifs au-delà de 18 mois : les résultats Access sont en accord avec ceux des autres tests de dépistage et du western-blot, quand ils ont été réalisés.

Nous avons constaté chez un certain nombre d'enfants notamment non infectés, une augmentation du rapport S/CO dans les 3 premiers mois de vie, suivie d'une diminution. Cette augmentation précoce et fugace, inexplicée

d'un point de vue physiopathologique, semble être en fait imputable au principe même de la technique. La réaction fait intervenir une phase de capture des immunoglobulines spécifiques du VIH par la protéine A, mais ce phénomène d'immunocapture met en compétition les immunoglobulines spécifiques avec les immunoglobulines totales. Ainsi le taux d'immunoglobulines totales influe sur le résultat semi-quantitatif du test Access, ce que nous avons démontré en testant des sérums contenant pour la même quantité d'anticorps spécifiques des concentrations croissantes d'immunoglobulines G (tableau 8). Chez les sujets séropositifs asymptomatiques, les valeurs obtenues sont significativement supérieures à celles obtenues chez les sujets symptomatiques. Cette variation peut être expliquée d'une part par l'hypergammaglobulinémie qui existe chez les sujets symptomatiques (51) et d'autre part par l'apparition de l'antigénémie p24 (supérieure à 120). De plus le suivi des dosages pondéraux des Ig G, A et M des enfants montre que tous naissent avec une hypergammaglobulinémie par rapport aux taux sériques trouvés à l'âge de 3 mois, probablement en raison de la clairance des immunoglobulines totales d'origine maternelle et de la faible capacité à produire leurs propres anticorps par immaturité immunitaire. L'augmentation du rapport S/CO apparaît d'autant plus importante que le titre initial d'Ig G de l'enfant à la naissance est élevé, et inversement. D'ailleurs chez deux enfants originaires d'Afrique Noire (enfants 1 et 11), dont le titre d'Ig G à la naissance est nettement plus élevé que pour les enfants blancs, la chute des immunoglobulines totales étant moins spectaculaire dans les 3 premiers mois, cette augmentation du rapport S/CO est moindre. D'autres facteurs interviennent peut-être pour expliquer cette variation du rapport S/CO : dans le cas de l'enfant 28, le taux d'immunoglobulines reste constant entre la naissance et l'âge de 1 mois mais le rapport S/CO augmente de 25 %. Chez les enfants infectés, ce phénomène n'a été observé que chez l'enfant 34, et ceci dans les mêmes circonstances, c'est à dire conjointement à une chute des Ig G entre la naissance et l'âge de trois mois. Pour les autres enfants infectés, en raison de la pénurie de prélèvements nous n'avons pas pu l'observer. Cependant pour interpréter les résultats du test Access chez les enfants infectés, il faudrait tenir compte du fait qu'à trois mois, ils présentent une hypergammaglobulinémie par rapport aux enfants non infectés (74). En outre, selon leur état clinique, des injections de gammaglobulines peuvent être réalisées très tôt, comme le cas de l'enfant 34 à l'âge de 2 mois (52).

Nous avons voulu voir si les résultats Access pouvaient, à un certain âge de l'enfant, être significatifs ou non de l'infection par le VIH. Pour cela, nous avons comparé les valeurs obtenues aux âges de 3, 6, 9 et 12 mois entre les enfants infectés et les enfants non infectés. La taille des échantillons ne nous permettant pas de les considérer comme normaux, nous avons fait appel à un test non paramétrique : le test de Mann et Withney. Il est apparu qu'avant l'âge de 12 mois, il n'existait pas de différence significative entre les valeurs obtenues chez les enfants infectés et non infectés. Par contre, à 12 mois, la différence est significative au seuil de 1%. Cependant, les valeurs des S/CO même à l'âge de 12 mois doivent être confrontés à la clinique et aux autres résultats biologiques (taux de lymphocytes CD4, antigénémie p24, culture virale, PCR), comme dans le cas de l'enfant 42. Ces résultats statistiques sont à confirmer sur des échantillons plus grands, notamment en ce qui concerne les enfants infectés.

Nous considérons que le suivi des enfants par le test Access HIV 1/2 présente un intérêt certain aussi bien dans le cas des enfants présumés non infectés que celui des enfants connus comme infectés.

Chez les enfants présumés non infectés, les sérologies classiques ne permettent pas une approche semi-quantitative avec les densités optiques obtenues lors de la lecture de la réaction ELISA. En revanche le test Access permet d'apprécier réellement la chute des anticorps spécifiques à partir de 6 mois en général. Cette chute est dans la pratique révélée par le western-blot, technique coûteuse et dont la lecture n'est pas toujours très objective puisqu'elle est réalisée par l'homme. Le test Access présente l'avantage d'être beaucoup moins cher, plus facilement réalisable et de lecture plus objective puisque automatisé. En outre, hormis l'aspect économique du test par rapport au western-blot, la compréhension des résultats par les parents d'enfants non infectés, pour qui l'enfant est toujours séropositif, pourrait être plus facile : ils pourraient voir la chute des anticorps représentée par la chute des valeurs de S/CO, jusqu'à la négativation du test.

Dans le cas des enfants infectés, le suivi par cette technique sérologique semi-quantitative pourrait permettre de préjuger de l'évolution de l'infection. Il serait intéressant de poursuivre cette étude sur un échantillon plus important d'enfants infectés verticalement par le virus du SIDA pendant plusieurs années. Dans notre étude, nous avons observé chez l'enfant 42, qui est rapidement entré dans une phase symptomatique et décédé du SIDA dans sa deuxième année, une chute rapide du rapport S/CO, jusqu'à une valeur très

basse ($S/CO=1,19$) à l'âge de 12 mois. Au contraire chez les enfants infectés 37 et 39, classés P1 dans la classification CDC, les valeurs obtenues avec le test Access ont montré une stabilité du taux des anticorps, en rapport avec le stade clinique. L'étude d'échantillons de taille plus élevée permettrait d'apprécier la valeur pronostic de la chute du rapport S/CO dans l'évolution d'enfants ou d'adultes vers la phase SIDA.

Le test Access HIV 1/2 ne pourra en aucun cas, seul, permettre de poser le diagnostic même à l'âge de 12 mois. Les techniques de diagnostic virologique actuellement utilisées, telles que la culture virale, la PCR et l'antigénémie ne peuvent être mise à l'écart. Cependant, dans certains pays en voie de développement, leur utilisation n'est pas courante dans le diagnostic de la transmission mère-enfant ; aussi le test Access HIV 1/2 pourrait-il avoir un intérêt, associé à d'autres paramètres cliniques et immunologiques, pour préjuger du statut des enfants nés de mères séropositives, tout au moins à l'âge de 12 mois d'après nos résultats. Le grand obstacle à l'utilisation de ce test dans le suivi des enfants nés de mères séropositives, dans les pays en voie de développement, réside dans l'investissement dans l'automate, même si celui-ci est un automate multiparamétrique.

Cette étude sur le test Access HIV 1/2 nous a permis d'apprécier la bonne sensibilité du test, sa facilité et sa rapidité d'exécution grâce au système d'immunoanalyse Access. Nous avons pu montrer l'aspect semi-quantitatif des résultats obtenus, ce qui confère à ce nouveau test un certain intérêt dans le suivi des enfants nés de mères séropositives, mais aussi, et cela reste à démontrer, dans le suivi des sujets séropositifs évoluant vers la phase SIDA. Nos résultats sur le suivi des enfants nés de mères séropositives sont à confirmer par une étude portant sur des échantillons de taille plus importante.

CONCLUSION

CONCLUSION

La sensibilité et la faisabilité du test Access HIV 1/2 en font dore et déjà un test tout à fait performant pour le dépistage de l'infection par le VIH.

Le suivi des enfants nés de mères infectées par le virus du SIDA par le test Access HIV 1/2, a permis de montrer son intérêt en analyse semi-quantitative.

En effet, la chute des anticorps chez les enfants non infectés est représentée par celle du rapport S/CO. L'aspect semi-quantitatif pourrait avoir un certain intérêt dans le suivi de sujets adultes séropositifs et d'enfants infectés verticalement, mais il reste à démontrer la valeur pronostique de ce test dans l'évolution vers la phase de SIDA.

Ce test est complémentaire des techniques de diagnostic direct, qui peuvent être réalisées dès la naissance. Il pourrait être réalisé chez les enfants nés de mères séropositives, présumés non infectés, pour faciliter la compréhension d'une sérologie toujours positive quelques mois après la naissance. En l'absence de signes cliniques évocateurs, la chute du taux des anticorps est en faveur d'une non contamination de l'enfant.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. **ALIMENTI A, LUZURIAGA K, STECHENBERG B, SULLIVAN J.L :** Quantitation of human immunodeficiency virus in vertically infected infants and children. *J Pediatr* 1991, **119**:225-29.
2. **ARICO M, CASELLI D, MARCONI M, AVANZINI M A, COLOMBO A, PASINETTI G, MACCABRUNI A, RONDANELLI E G, BURGIO R :** Immunoglobulin G3-specific antibodies as marker for early diagnosis of HIV infection in children. *AIDS* 1991, **5**:1315-8.
3. **ASSOCIATION DES PROFESSEURS DE MICROBIOLOGIE :** Les virus de l'immunodéficience humaine. Dans *Virologie Médicale*, 14^e édition 1992, édité par C. et R.. p.378-403.
4. **BERNSTEIN L J, OCHS H D, WEDGWOOD R J, RUBINSTEIN A :** Defective humoral immunity in pediatric acquired immune deficiency syndrome. *J Pediatr* 1985, **107**:352-7.
5. **BLANCHE S, MAYAUX M.J, ROUZIOUX C, TEGLAS J.P, FIRTION G, MONPOUX F, CIRARU-VIGNERON N, MEIER F, TRICOIRE J, COURPOTIN C, VILMER E, GRISCELLI C, DELFRAISSY J.F, AND THE FRENCH PEDIATRIC HIV INFECTION STUDY GROUP :** Relation of the course of HIV infection in children to severity of the disease in their mothers at delivery. *N Engl J Med* 1994, **330**:308-12.
6. **BLANCHE S, ROUZIOUX C, GUIHARD MOSCATO ML, VEBER F, MAYAUX MJ, JACOMET C, TRICOIRE J, DEVILLE A, VIAL M, FIRTION G, DE CREPY A, DOUARD D, ROBIN M, COURPOTIN C, CIRASU-VIGNERON N, LE DEIST F, GRISCELLI C, AND THE HIV IN NEWBORNS FRENCH COLLABORATIVE STUDY GROUP :** A prospective study of infants born to women seropositive for human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med* 1989, **320**:1643-1648.
7. **BOGARD M :** Techniques d'amplification en biologie moléculaire. *Immunoanal Biol Spéc* 1994, **9**:68-82.
8. **BORKOWSKY W, KRASINSKI K, POLLACK H, HOOVER W, KAUL A, ILMET-MOORE T :** Early diagnosis of human immunodeficiency virus infection in children < 6 months of age: comparison of polymerase chain reaction, culture, and plasma antigen capture techniques. *J Infect Dis* 1992, **166**:616-19.

9. **CENTER OF DISEASE CONTROL** : Classification system for human immunodeficiency virus (HIV) infection in children under 13 years of age. *MMWR* 1987, **36**:225-36.
10. **CLAVEL F** : Données virologiques nouvelles : réplication et persistance du virus de l'immunodéficience humaine. *Rev Prat* 1992, **42**:142-6.
11. **D'ARMINIO MONFORTE A, NOVATI R, GALLI M, MARCHISIO P, MASSIRONI E, TRONAGHI R, SARACCO A, PRINCIPI N, MORONI M** : T-cell subsets and serum immunoglobulins levels in infants born to HIV seropositive mothers : a longitudinal evaluation. *AIDS* 1990, **4**:1141-4.
12. **DE MARTINO M, TOVO P A** : Quantifying the risk of HIV-1 transmission via breast-milk (reply). *AIDS* 1993, **7**:134-35.
13. **DE MARTINO M, TOVO P.A, GALLI L, CASELLI D, GABIANO C, MAZZONI P.L, GIACOMELLI A, DUSE M, FUNDARO C AND THE ITALIAN REGISTRER FOR HIV INFECTION IN CHILDREN** : HIV-1 infection in perinatally sibilings and twins. *Arch Dis Child* 1991, **66**:1235-38.
14. **DE MARTINO M, TOVO P A, TOZZI A E, PEZZOTTI P, GALLI L, LIVADIOTTI S, CASELLI D, MASSIRONI E, RUGA E, FIOREDDA F, PLEBANI A, GABIANO C, ZUCCOTTI G V** : HIV-1 transmission through breast-milk: appraisal of risk according to duration of feeding. *AIDS* 1992, **6**:991-97.
15. **DENAMUR E, LEVINE M, SIMON F, ROHRLICH, CAVE H, RHIMY C, DE CREPY A, BOISSINOT C, LARCHEE R, LESCOEUR B, ELION J, BRUN-VEZINET F, VILMER E** : Conversion of HIV 1 viral markers during the first few months of life in HIV infected children born to seropositive monthers. *AIDS* 1993, **7**:897-899.
16. **DENIS F, LEONARD G, VERDIER M, RANGER S, MOUNIER M** : Diagnostic virologique des infections par les virus de l'immunodéficience humaine. *Rev Eur Dermatol MST* 1990, **2**:127-34.
17. **DENIS F, MARTIN P, RANGER S** : Diagnostic virologique des infections par le virus de l'hépatite C. *Eurobiologiste* 1992, **26**:231-244.
18. **DENIS F, M'BOUP S, SANGARE A, LEONARD G, VERDIER M, RANGER S** : Les virus de l'immunodéficience humaine. Structure, organisation génétique, réplication. Dans *SIDA infection à VIH, aspects en zone tropicale*, édité par Ellipses. Paris. p. 12-32.
19. **DE ROSSI A, ADES A.E, MAMMANO F, DEL MISTRO A, AMADORI A, GIAQUINTO C, CHIECO-BIANCHI L** : Antigen detection, virus culture, polymerase chain reaction, and in vitro antibody production in the diagnosis of vertically transmitted HIV-1 infection. *AIDS* 1991, **5**:15-20.

20. **DEVASH Y, CALVELLI TA, WOOD D G** : Vertical transmission of human immunodeficiency virus is correlated with the absence of high affinity / avidity maternal antibodies to the gp120 principal neutralizing domain . Proc Natl Acad Sci USA 1990, **87**:3445-49.
21. **DUNN D, NEWELL M L** : Quantifying the risk of HIV-1 transmission via breast-milk. AIDS 1993, **7**:134.
22. **DUNN D T, NEWELL M L, ADES A E, PECKHAM C S** : Risk of human immunodeficiency virus type 1 transmission through breastfeeding. Lancet 1992, **340**:585-88.
23. **EHRNST A, LINDGREN S, BELFRAGE E, SÖNNERBORG A, DICTOR M, JOHANSSON B, BOHLIN A.B** : Intrauterine and intrapartum transmission of HIV. Lancet 1992, **339**:245-246.
24. **EHRNST A, LINDGREN S, DICTOR M, JOHANSSON B, SÖNNERBORG A, CZAJKOWSKI J, SUNDIN G, BOHLIN A.B** : HIV in pregnant women and their offspring : evidence for late transmission. Lancet 1991, **338**:203-207.
25. **ELLAURIE M, CALVELLI T A, RUBINSTEIN A** : Human immunodeficiency virus (HIV) circulating immune complexes in infected children. AIDS Res Human Retroviruses 1990,**6**:1437-41.
26. **EUROPEAN COLLABORATIVE STUDY** : Children born to women with HIV 1 infection : natural history and risk of transmission. Lancet 1991, **337**:253-259.
27. **EUROPEAN COLLABORATIVE STUDY** : How necessary is Western-blot in the follow-up of children of HIV-infected mothers ? AIDS 1992, **12**:1544-1545.
28. **FAUCI A S** : Immunopathogenesis of HIV infection. J Acquir Immune Defic Syndr 1993, **6**:655-62.
29. **FAUCI A S, SCHNITTMAN S M, POLI G, KOENIG S, PANTALEO G** : Immunopathogenic mechanisms in human immunodeficiency virus (HIV) infection. Annals of Internal Medicine 1991, **114**:678-93.
30. **FERNANDEZ-CRUZ E, DESCO M, GARCIA MONTES M, LONGO N, GONZALEZ B, ZABAY J.M** : Immunological and serological markers predictive of progression to AIDS in a cohort of HIV-infected drug users. AIDS 1990, **4**:987-994.
31. **FERRONI A, MAYMAT D, BLANCHE S, ORTIGAO M B, BURGARD M, IVANOFF S, ROUZIOUX C** : HIV-1 quantification in infected children born to seropositive mothers. AIDS 1993, **9**:1271-2.

32. **FREIER C, LEFAY D** : Access : Présentation d'un nouvel automate d'immunoanalyse multiparamétrique. Document Sanofi Diagnostics Pasteur.
33. **GREENSPOON J.S, HURD SETTLAGE R** : Isolation of human immunodeficiency virus from placenta or maternal blood contaminating the placenta ? Am J Obstet Gynecol 1989, **161**:501-502.
34. **GRUTERS R A, TERPSTRA F G, DE GOEDE R E Y, MULDER J W, DE WOLF F, SCHELLENKERS P T A, VAN LIER R A W, TRESMETTE M MIEDEMA F** : Immunological and virological markers in individuals progressing from seroconversion to AIDS. AIDS 1991, **5**:837-44.
35. **GUETTARI N, SILVY F, TAMALET C, SAUVAIGO S, PERRIMOND H, MICHEL G, THURET I, DE BOISSE P, LECLAIRE M, BLANC B, MARTIN-LAVAL A, TEOULE R, CHERMANN J.C** : Modified nested polymerase chain reaction for the detection of HIV-1 infection in children. AIDS 1993, **9**:1269-1271.
36. **GUPTA P, BRADY M, RAABE M, URBACH A** : Detection of human immunodeficiency virus by virus culture and polymerase chain reaction in children born to seropositive mothers. J Acquir Immune Defic Syndr 1991, **4**:1004-6.
37. **HAMMER S, CRUMPACKER C, D'AQUILA R, JACKSON B, LATHEY J, LIVNAT D, REICHELDERFER P** : Use of virologic assays for detection of human immunodeficiency virus in clinical trials: recommendations of the AIDS clinical trials group virology committee. J Clin Microbiol 1993, **10**:2557-64.
38. **HILL W.C, BOLTON V, CARLSON J.R** : Isolation of acquired immunodeficiency syndrome virus from the placenta. Am J Obstet Gynecol 1987, **157**:10-11.
39. **HUTTO C, PARKS W.P, LAI S, MASTRUCCI M.T, MITCHELL C, MUNOZ J, TRAPIDO E, MASTER I.M, SCOTT G.B** : A hospital-based prospective study of perinatal infection with human immunodeficiency virus type 1. J Pediatr 1991, **118**:347-53.
40. **ITALIAN REGISTER FOR HIV INFECTION IN CHILDREN** : Features of children perinatally infected with HIV-1 surviving longer than 5 years. Lancet 1994, **343**:191-5.
41. **JANSSON M, WAHREN B, SCARLATTI G, PRINCIPI N, LOMBARDI V, LIVADIOTTI S, ELIA L, PLEBANI A, WIGZELL H, ROSSI P** : Patterns of immunoglobulin G subclass reactivity to HIV-1 envelope peptides in children born to HIV-1 infected mothers. AIDS 1992, **6**:365-71.

42. **JOHNSTONE F.D, MOK J, PEUTHERER J.F** : Vertical HIV transmission in pregnancy. *Lancet* 1991, **338**:829.
43. **KATZ S, WILFERT C** : Human immunodeficiency virus infection of newborns. *N Engl J Med* 1989, **320**:1687-1689.
44. **KRIVINE A, FIRTION G, CAO L, FRANCOUAL C, HENRION R, LEBON P** : HIV replication during the first weeks of life. *Lancet* 1992, **339**:1187-89.
45. **LEFAY D, FREIER C, DU FOU DE Kerdaniel** : *Access HIV 1/2* :Présentation d'un nouveau test automatisé de dépistage des anticorps anti-HIV 1 et anti-HIV2 en chimioluminescence. Document Sanofi Diagnostics Pasteur.
46. **LEPAGE P, DABIS F, HITIMANA D.G, MSELLATI P, VAN GOETHEM C, STEVEN A.M, NSENGUMUREMYI F, BAZUBAGIRA A, SERUFILIRA A, DE CLERCQ A, VAN DE PERRE P** : Perinatal transmission of HIV-1: lack of impact of maternal HIV infection on characteristics of livebirths and on neonatal mortality in Kigali, Rwanda. *AIDS* 1991, **5**:295-300.
47. **LEPAGE P, MSELLATI P, VAN DE PERRE P, HITIMANA D G, DABIS F** : Characteristics of newborns and HIV-1 infection in Rwanda. *AIDS* 1992, **6**:883-3.
48. **LEPAGE P, VAN DE PERRE P, CARAEL M, NSENGUMUREMYI F, NKURUNZIZA J, BUTZLER J P, SPRECHER S** : Postnatal transmission of HIV from mother to child. *Lancet* 1987, **2**:400.
49. **LEWIS S.H, REYNOLDS-KOHLER C, FOX H.E, NELSON J.A** : HIV-1 introphoblastic and villous Hofbauer cells and haematologic precursors in eight-week fetuses. *Lancet* 1990, **335**:565-68.
50. **LUZURIAGA K, MC QUILKEN P, ALIMENTI A, SOMASUNDARAN M, HESSELTON R A, SULLIVAN J L** : Early viremia and immune responses in vertical human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 1993, **167**:1008-13.
51. **MIZUMA H, ZOLLA PAZNER S, LITWIN S, EL SADR W, SHARPE S, ZEHR B, WEISS S, SAXINGER W C, MARMOR M** : Serum IgD elevation is early marker of B cell activation during infection with the human immunodeficiency viruses. *Clin Exp Immunol* 1987, **68**:5-14.

52. **MOFENSON L.M, BETHEL J, MOYE J, FLYER P, AND NUGENT R FOR THE NATIONAL INSTITUTE OF CHILD HEALTH AND HUMAN DEVELOPMENT INTAVENOUS IMMUNOGLOBULIN CLINICAL TRIAL STUDY GROUP** : Effect of intravenous immunoglobulin (IVIG) on CD4+ lymphocyte decline in HIV-infected children in a clinical trial of IVIG infection prophylaxis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1993, **6**:1103-1113.
53. **NAIR P, ALGER L, HINES S, SEIDEN S, HEBEL R, JOHNSON JP** : Maternal and neonatal characteristics associated with HIV infection in infants of seropositive women. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1993, **6**:298-302.
54. **NEWELL M L, PECKHAM C, LEPAGE P** : HIV-1 infection in pregnancy: implications for women and children. *AIDS* 1990, **4**(suppl 1):S111-S117.
55. **OLESKE J, MINNEFOR A, COOPER R, THOMAS K, DELA CRUZ A, AHDIEH H, GUERRERO I, JOSHI V.V, DESPOSITO F** : Immune deficiency syndrome in children. *JAMA* 1983, **249**:2345-49.
56. **PALOMBA E, GAY L, DE MARTINO M, PERUGINI L, TOVO P.A** : Sensitivity and specificity of complexed p24 antigen assay for early diagnosis of perinatal HIV infection. *AIDS* 1993, **10**:1391-1393.
57. **PATERLINI P, LALLEMANT LE COEUR S, M'PELE P, DAZZA M C, TERRE S, MONCANY M, JOURDAIN G, COURGNAUD V, N'ZINGOULA S, LAROUZE B, GRISCELLI C, BRECHOT C** : Polymerase chain reaction for studies of mother to child transmission of HIV-1 in Africa. *J Med Virol* 1990, **30**:53-57.
58. **PEUCHMAUR M, PONS J.C, PAPIERNIK E, DELFRAISSY J.F** : Isolation of acquired immunodeficiency syndrome virus from placenta. *Am J Obstet Gynecol* 1989, **160**:765.
59. **QUINN T C, KLINE R, MOSS M W, LIVINGSTON R A, HUTTON N** : Acid dissociation of immune complexes improves diagnostic utility of p24 antigen detection in perinatally acquired human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1993, **167**:1193-6.
60. **RAKUSAN T.A, PARROTT R.H, SEVER J.L** : Limitations in the laboratory diagnosis of vertically acquired HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1991, **4**:116-121.

61. **ROGERS M F, OU C, RAYFIELD M, THOMAS P A, SCHOENBAUM E E, ABRAMS E, KRASINSKI K, SELWYN P A, MOORE J, KAUL A, GRIMM K T, BAMJI M, SCHOCHETMAN G, AND THE NEW-YORK CITY COLLABORATIVE STUDY OF MATERNAL HIV TRANSMISSION AND MONTEFIORE MEDICAL CENTER HIV PERINATAL TRANSMISSION STUDY GROUP** : Use of the polymerase chain reaction for early detection of the proviral sequences of human immunodeficiency virus in infants born to seropositive mothers. *N Engl J Med* 1989, **320**:1649-54.
62. **ROSSI P, MOSCHESE V, BRODILEN P A** : Presence of maternal antibodies to human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120 epitopes correlates with the uninfected status of children born to seropositive mothers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, **86**:8055-58.
63. **ROUZIUX C, COSTAGLIOLA D, BURGARD M, BLANCHE S, MAYAUX M.J, GRISCELLI C, VALERON A.J AND THE HIV INFECTION IN NEWBORNS FRENCH COLLABORATIVE STUDY GROUP** : Timing of mother-to-child HIV-1 transmission depends on maternal status. *AIDS* 1993, **7** (suppl 2):S49-S52.
64. **ROUZIUX C, PUEL J, AGUT H, BRUN-VEZINET F, FERCHAL F, TAMALET C, DESCAMPS P, FLEURY H** : Comparative assessment of quantitative HIV viraemia assays. *AIDS* 1992, **6**:373-377.
65. **RYDER R.W, HASSIG S.E** : The epidemiology of perinatal transmission of HIV. *AIDS* 1988, **2** (suppl 1):s83-s89.
66. **RYDER R.W, NSA W, HASSIG S.E, BEHETS F, RAYFIELD M, EKUNGOLA B, NELSON A.M, MULENDA U, FRANCIS H, MWANDAGALIRWA K, DAVACHI F, ROGERS M, NZILAMBI N, GREENBERG A, MANN J, QUINN T.C, PIOT P, CURRAN J.W** : Perinatal transmission of the human immunodeficiency virus type 1 to infants of seropositive women in Zaire. *N Engl J Med* 1989, **320**:1637-42.
67. **SCHIAVINI D G, PUEL J, AVEROUS S A, BAZEX J A** : Quantitative western immunoblotting analysis in survey of human immunodeficiency virus seropositive patients. *J Clin Microbiol* 1989, **27**:2062-6.
68. **SIMON F, RAHIMY C, KRIVINE A, LEVINE M, PEPIN J M, LAPIERRE D, DENAMUR E, VERNOUX L, DE CREPY A, BLOT P, VILMER E, BRUN-VEZINET F** : Antibody avidity measurement and immune complex dissociation for serological diagnosis of vertically acquired HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1993, **6**:201-7.
69. **SPRECHER S, SOUMENKOFF G, PUISSANT F, DEGUELDRE M** : Vertical transmission of HIV in 15-week fetus. *Lancet* 1986, **ii**:288-89.

70. **THIRY L, SPRECHER-GOLDBERGER S, JOCKHEER T** : Isolation of AIDS virus from cell free breast milk of three healthy virus carriers. Lancet 1985, ii:891-92.
71. **TINDALL B, COOPER D A** : Primary HIV infection : host responses and intervention strategies. AIDS 1991, 5:1-14.
72. **TOVO P A** : Ceasarean section and perinatal HIV transmission : what next ? Lancet 1993, 342:630.
73. **TOVO P.A, DE MARTINO M, GABIANO G, CAPPELLO N, D'ELIA R, LOY A, PLEBANI A, ZUCCOTTI G.V, DALLACASA P, FERRARIS G, CASELLI D, FUNDARO C, D'ARGENIO P, GALLI L, PRINCIPI N, STEGEGNO M, RUGA E, PALOMBA E AND THE ITALIAN REGISTER FOR HIV INFECTION IN CHILDREN** : Prognostic factors and survival in children with perinatal HIV-1 infection. Lancet 1992, 339:1249-53.
74. **TRICOIRE J, CLAEYSSENS-DONADEL S, ROBERT A, ROLLAND M, MOULIN F, KULHEIN E, BERREBI A, IZOPET J, PUEL J** : Evaluation longitudinale des sous- populations lymphocytaires et immunoglobulines sériques chez les enfants nés de mère VIH séropositive. Pédiatrie 1993, 48:283-286.
75. **TUDOR-WILLIAMS G** : Early diagnosis of vertically acquired HIV-1 infection. AIDS 1991, 5:103-5.
76. **VAN DE PERRE P, HITIMANA D G, SIMONON A, DABIS F, MSELLATI P, KARITA E, LEPAGE P** : Postnatal transmission of HIV-1 associated with breast abscess. Lancet 1992, 339:1490-91.
77. **VITTECOQ D** : Utilisation du Rétrovir^R pendant la grossesse chez la femme infectée par le VIH. La Lettre du Pharmacologue 1994, 8:120-121.
78. **WILLIAMS P, SIMMONDS P, LEE YAP P, BALFE P, BISHOP J, BRETTLE R, HAGUE R, HARGREAVES D, INGLIS J, LEIGH BROWN A, PEUTHERER J, REBUS S, MOK J** : The polymerase chain reaction in the diagnosis of vertically transmitted HIV infection. AIDS 1990, 4:393-398.



TABLE DES
MATIERES

TABLE DES MATIERES

<u>INTRODUCTION</u>	7
<u>PREMIERE PARTIE</u>	9
1. GENERALITES SUR LES VIRUS VIH 1 ET VIH 2	10
<u>1.1 Structure et organisation génique</u>	10
1.1.1 Morphologie.....	10
1.1.2 Organisation génique.....	10
1.1.3 Variabilité génétique.....	14
<u>1.2 Réplication des virus VIH</u>	15
1.2.1 Réplication virale proprement dite.....	15
- Fixation du virus à la cellule cible	
- Pénétration du virus dans la cellule hôte	
- Production et libération du virion	
1.2.2 Réplication et étapes de l'infection.....	17
2. TRANSMISSION MERE-ENFANT DU VIH	20
<u>2.1 Modes de transmission périnatale</u>	20
2.1.1 Transmission in utero.....	21
2.1.2 Contamination per partum.....	22
2.1.3 Transmission après la naissance.....	22
<u>2.2 Incidence de la transmission verticale</u>	23
<u>2.3 Conséquences de la transmission périnatale</u>	24
<u>2.4 Modes de prévention de la contamination mère-enfant</u>	27

3. DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE DE L'INFECTION VERTICALE A VIH.....29

3.1 <u>Détection des anticorps anti VIH</u>.....	29
3.1.1 Les tests ELISA.....	29
3.1.2 Le western-blot.....	30
3.2 <u>Détection de l'antigène p24 circulant</u>.....	32
3.3 <u>Culture du virus VIH</u>.....	33
3.4 <u>Détection du génôme viral par hybridation moléculaire</u>.....	35
3.4.1 Hybridation in situ.....	35
3.4.2 Amplification génique.....	35
3.5 <u>Production d'anticorps in vitro</u>.....	38
3.6 <u>Marqueurs non spécifiques de l'infection</u>.....	39
3.6.1 Taux des lymphocytes CD4 et CD8.....	39
3.6.2 Hypergammaglobulinémie.....	39
3.6.3 β 2 microglobuline et néoptérine.....	39

DEUXIEME PARTIE.....41

1. MATERIEL ET METHODE.....42

1.1 <u>Echantillons testés sur le système ACCESS</u>.....	42
1.1.1 Etude préliminaire.....	42
- Sujets séropositifs asymptomatiques	
- Sujets séropositifs symptomatiques	
- Sujets VIH séropositifs suivis pendant un an	
1.1.2 Etude des prélèvements d'enfants nés de mères séropositives.....	43
- Enfants nés de mères VIH séropositives	
- Pool de sérums séropositifs contenant des quantités croissantes de gammaglobulines	

1.2 <u>Système d'immunoanalyse ACCESS</u>	45
1.2.1 Principe du test.....	45
1.2.2 Description du système ACCESS.....	46
2. RESULTATS	48
2.1 <u>Etude préliminaire</u>	48
2.1.1 Etudes de sujets VIH-1 séropositifs asymptomatiques et symptomatiques.....	48
2.1.2 Suivi de cinq sujets séropositifs pendant un an.....	48
2.2 <u>Suivi des enfants nés de mères séropositives</u>	49
2.2.1 Enfants non infectés.....	49
2.2.2 Enfants infectés.....	51
2.2.3 Comparaisons des valeurs de S/CO entre enfants infectés et non infectés.....	53
2.2.4 Dilutions de gammaglobulines dans un pool de sérum VIH séropositifs.....	54
3. DISCUSSION	97
<u>CONCLUSION</u>	101
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	103



RESUME

Les nouveaux cas pédiatriques de syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) résultent le plus souvent d'une transmission verticale du virus, dont le taux varie de 8 à 45 %. Le diagnostic antenatal n'étant pas possible actuellement, celui-ci est réalisé en post natal, par une association de différentes techniques, donnant un diagnostic plus ou moins précoce.

Ce travail a permis de montrer l'aspect semi-quantitatif du test Access HIV 1/2, dans le suivi de 42 enfants nés de mères VIH séropositives, dont 9 d'entre eux ont été infectés. Les sérums des enfants ont été testés de la naissance à l'âge de 18 mois et au-delà. Les résultats obtenus avec le test Access HIV 1/2 montrent une chute des anticorps jusqu'à une négativation du test pour les enfants non infectés et une bonne sensibilité puisque certains d'entre eux présentent un résultat positif au delà de 18 mois. Dans le cas des enfants infectés, les résultats restent stables dans un contexte clinique non évolutif ; il faut noter une chute importante des valeurs obtenues dans le cas d'un enfant qui décédera à l'âge de deux ans.

De plus, l'influence du taux d'immunoglobulines totales sur les résultats, constatée avec le test Access HIV 1/2, est expliquée par le principe même du test, qui réalise une immunocapture sur particules paramagnétiques sensibilisées par la protéine A.

Ce test apparaît donc comme un test de bonne sensibilité ; l'aspect semi-quantitatif lui confère un certain intérêt dans le suivi des enfants nés de mères infectées par le virus du SIDA.

MOTS CLES

- SIDA
- VIH
- Enfant
- Test immunoenzymatique

