



HAL
open science

**STATUT EN VITAMINE D ET POLYMORPHISME
DU GENE DE SON RECEPTEUR CHEZ DES
PERSONNES VIVANT AVEC LE VIRUS DE
L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE (PVVIH) EN
CÔTE D'IVOIRE**

Aya Jeanne Armande Ake

► **To cite this version:**

Aya Jeanne Armande Ake. STATUT EN VITAMINE D ET POLYMORPHISME DU GENE DE SON RECEPTEUR CHEZ DES PERSONNES VIVANT AVEC LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE (PVVIH) EN CÔTE D'IVOIRE. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Félix Houphouët Boigny (Abidjan, Côte d'Ivoire), 2019. Français. NNT: . tel-02387674

HAL Id: tel-02387674

<https://theses.hal.science/tel-02387674>

Submitted on 30 Nov 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE
Union-Discipline-Travail

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique



Laboratoire de
Pharmacodynamie-biochimique

Année Universitaire
2018 - 2019

THESE

Présentée pour l'obtention du Titre de Docteur de
l'Université Félix HOUPHOUËT- BOIGNY

BIOTECHNOLOGIE-BIOSECURITE-BIORESSOURCES

Spécialité : Biologie fonctionnelle et moléculaire

Option : Biochimie-Biologie moléculaire

Mlle AKE Aya Jeanne Armande

Numéro d'ordre
2212 / 2019

**STATUT EN VITAMINE D ET POLYMORPHISME DU
GENE DE SON RECEPTEUR CHEZ DES PERSONNES
VIVANT AVEC LE VIRUS DE
L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE (PVVIH) EN
CÔTE D'IVOIRE**

Commission du jury

**Soutenu publiquement
Le, 20 Septembre 2019**

M. KOUASSI Kouassi Philippe	Professeur Titulaire	UFHB	Président
M. YAPO Adou Francis	Professeur Titulaire	UFHB	Directeur
M. DJAMAN Allico Joseph	Professeur Titulaire	UFHB	Co-Directeur
M. NGUETTA A. S-Pierre	Professeur Titulaire	UFHB	Rapporteur
M. TOURE André Offianan	Maître de Recherche	IPCI	Rapporteur
M. ACKAH J. A. A. Bognan	Maître de Conférences	UJLOG	Examineur



" L'humilité pour un scientifique est d'accepter que rien ne soit impossible."

Marc Lévy

DEDICACES

Je dédie cette thèse:

A mon Seigneur, Dieu Tout-Puissant

Je ne saurai Seigneur comment te remercier pour tous tes bienfaits à mon égard. Tu m'as toujours assistée dans les moments difficiles comme agréables de ma vie. Tu m'as donnée la force et la patience d'accomplir ce travail. Si j'ai pu atteindre ce but, c'est par ta Grâce et ta Miséricorde. " Puisse ta crainte toujours m'habiter, afin de te servir fidèlement. "

A mon père, ARRA Aké René

Je te remercie pour ton soutien. Tu m'as appris la rigueur, l'amour du travail bien fait, la ponctualité, le respect de ses convictions et de ses engagements. Tu as toujours stimulé en moi le goût des études. Tes efforts déployés à mon égard n'ont pas été vains.

En ce jour, j'espère réaliser l'un de tes rêves.

A ma mère, Madame AKE née Lolo Cousso Suzanne

Merci pour tes prières, ton dévouement sans faille et pour les efforts consentis à mon égard. Tu m'as toujours soutenu et tu as toujours cru en moi. Pour tout cela et pour beaucoup plus encore je te remercie infiniment.

" Puisse Dieu vous bénir et vous garder papa et toi longtemps en bonne santé !"

A SERI Kipré Laurent

Mon compagnon de tous les jours et mon âme-sœur ! Je te remercie pour tout le bonheur que tu m'apportes jour après jour. Ta présence, ta confiance, ta patience, tes conseils, ton aide et tes prières m'ont été d'un apport appréciable. Merci pour ton implication personnelle et les sacrifices accomplis dans la réalisation de ce travail et pour tout. Merci d'avoir toujours cru en moi, d'être là et d'être toi, tout simplement. Merci pour ton soutien, pour ton amour et pour les belles années à venir. Merci pour tout.

A Marie-Mylène & Marc-Aurel

Mes rayons de soleil ! Vous voir grandir chaque jour me donne toujours plus de joie et de force pour aller de l'avant. Puisse ce travail, vous montrer la voie à suivre.

" Que Dieu vous préserve de tout mal et vous procure une longue vie!

Qu'il vous comble de santé, de bonheur, et exauce tous vos vœux".

A mes frères et ma petite sœur

Narcisse, Je ne saurais exprimer la profondeur des sentiments fraternels, d'attachement et d'amour que j'éprouve à ton égard. Tu m'as toujours soutenu avec générosité et amour. Tu ne m'as jamais abandonnée, toujours prêt à me venir en aide et me protéger.

Toute mon affection et ma reconnaissance.

Edwige, une sœur comme on ne peut trouver nulle part ailleurs. Tu as été sans le savoir mon "*leitmotiv*" pour toujours progresser sans faillir. Ton amour et ton soutien ne m'ont jamais fait défaut. Sois toujours ma petite sœur adorée.

Je vous souhaite tout le bonheur du monde. Puisse Dieu vous protéger, garder et renforcer notre fraternité.

Elisée et Clément, je vous dédie ce travail en témoignage de mon grand respect et mon estime envers vous. Pour vos conseils, votre soutien moral et spirituel indéfectible.

Puisse Dieu vous garder et vous combler de bonheur.

A ma famille

Mado ! ma belle-sœur, Nomel Wilson ! mon beau-frère, Blanche et Emma ! mes belles-sœurs, Emmanuel ! Arielle ! Lauriane ! Elsa ! Jules et Anna, tous mes beaux-parents, mes oncles, mes tantes, mes cousins et cousines. Vous savoir à mes côtés, représente un bonheur pour moi. Soyez toujours unis, endurants et patients, la réussite est au bout de l'effort. Puisse ce travail raffermir davantage les liens qui nous unissent.

A la mémoire de mes grands parents

Qui ont été toujours dans mon esprit et dans mon cœur, je vous dédie aujourd'hui ma réussite.

Que vous reposiez dans le paradis du Seigneur.

Merci au reste de ma grande famille que j'adore pour leur soutien indéfectible.

REMERCIEMENTS

Mes sincères remerciements

A Monsieur KARAMOKO Abou, Professeur Titulaire de Philosophie, Président de l'Université Félix Houphouët-Boigny.

Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance et toute ma gratitude pour m'avoir acceptée et pour avoir autorisé mon inscription en thèse à l'Université Félix Houphouët-Boigny.

A Monsieur KOUAMELAN Essetchi Paul, Professeur Titulaire d'Hydrobiologie à l'Université Félix Houphouët-Boigny, Directeur de l'Unité de Recherche et de Formation (l'UFR) Biosciences.

Je vous exprime toute ma reconnaissance pour avoir autorisé mon inscription en thèse unique de Biologie Fonctionnelle et Moléculaire au Laboratoire de Pharmacodynamie-biochimique de l'UFR Biosciences dont vous avez la charge.

A Madame DOSSO Mireille, Professeur Titulaire de Bactériologie-Virologie à l'Université Félix Houphouët-Boigny, Directeur de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI).

Je vous remercie pour m'avoir permis d'intégrer le département de Biochimie médicale et fondamentale de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI) dans le cadre de mes stages de Master et de Thèse.

A Monsieur DJAMAN Allico Joseph, Professeur Titulaire de Biochimie-Parasitologie à l'Université Félix Houphouët-Boigny, UFR Biosciences, Directeur du Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique, Chef du Département de Biochimie médicale et fondamentale de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI), **mon Co-Directeur de Thèse**.

J'exprime ma reconnaissance et gratitude à mon maître et initiateur du thème de cette thèse, pour l'esprit de créativité et d'enthousiasme qu'il ne cesse de nous communiquer. Vous avez été toujours un exemple pour moi par vos qualités humaines et professionnelles, votre abnégation dans l'investigation scientifique, votre persévérance, votre perfectionnisme et votre humilité. Tous les mots réunis ne sauraient traduire toute ma gratitude et mon profond respect. Depuis mon Master, vous avez accordé une attention particulière à mes travaux de Recherche. Malgré votre calendrier chargé et votre état de santé, vous n'avez ménagé aucun effort pour conduire à son terme le présent travail. Vous avez conduit ma formation vers l'excellence en m'orientant, me responsabilisant et en m'initiant à l'encadrement. Tel un père qui achève l'éducation de sa fille, vous m'avez donné tous les rudiments nécessaires pour affronter le futur ou l'avenir. Votre orientation, votre confiance et surtout votre patience ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené à bon port. Trouvez dans ce travail un hommage vivant à votre haute personnalité.

Puisse Dieu vous préserver, vous procurer Santé, Longévité, Prospérité et Bonheur.

A Monsieur YAPO Adou Francis, Professeur Titulaire de Biochimie-Pharmacologie au Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique à l'Université Félix Houphouët-Boigny, UFR Biosciences, Responsable pédagogique des enseignements du Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique et Membre de la commission pédagogique de l'UFR Biosciences, **mon Directeur de thèse**.

Les conseils que vous m'avez prodigués, la patience et la confiance que vous m'avez témoignées ont été déterminants dans la réalisation de cette étude de recherche. En tant que Directeur de thèse, vous vous êtes montré très disponible. Vous avez encouragé mes initiatives à travers la grande liberté d'actions que vous m'autorisiez. Je vous suis reconnaissante pour le temps que vous consacrez à mes questions et préoccupations, sans oublier votre encadrement et votre participation tout au long de mes travaux de thèse. Je suis ravie d'avoir travaillé en votre compagnie car outre votre appui scientifique, votre rigueur, votre dynamisme, votre courtoisie, votre humilité et votre méthodologie dans le travail ; vous m'avez soutenu et conseillé au cours de l'élaboration de ce travail et guidé sur les sites pour un bon échantillonnage. Vous êtes un chercheur de qualité et vous représentez un modèle pour nous. Soyez assuré de ma profonde gratitude cher Maître. Puisse Dieu exaucer vos vœux les plus chers.

A Monsieur KOUASSI Kouassi Philippe, Professeur Titulaire d'Ecologie Animale à l'Université Félix Houphouët-Boigny, UFR Biosciences, Président de la Commission Scientifique de l'UFR Biosciences à l'Université Félix Houphouët-Boigny.

Je voudrais vous traduire mes sincères remerciements pour avoir accepté de présider le jury de ma thèse. Honorable professeur, votre humilité, votre dynamisme, votre disponibilité et votre ardeur dans le travail sont à féliciter. Que Dieu vous assiste d'avantage dans l'exercice de votre fonction et qu'il vous accorde une très longue vie couronnée par une très bonne santé.

A Monsieur N'GUETTA Assanvo Simon-Pierre, Professeur Titulaire de Génétique, Amélioration des Plantes et Statistiques à l'Université Félix Houphouët-Boigny, Directeur du Laboratoire de Génétique, Amélioration des espèces, UFR Biosciences.

Merci Professeur pour votre courtoisie, votre disponibilité et de prendre part au jury de ma thèse. Je vous suis infiniment reconnaissante pour le temps consacré à la lecture de tout ce travail en qualité de rapporteur. Je vous remercie pour vos remarques pertinentes et vos conseils précieux qui m'ont beaucoup aidée à améliorer la qualité de ce travail. Soyez assuré, cher Maître, de mon estime et de ma profonde gratitude.

A Monsieur TOURE André Offianan, Maître de Recherche de Parasitologie-Mycologie à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire et Chercheur Principal du Département de Parasitologie et Mycologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.

C'est pour moi un grand honneur de vous voir siéger dans notre jury. Permettez-moi de vous exprimer toute ma gratitude pour la spontanéité et l'amabilité avec lesquelles vous avez accepté de juger ce travail en qualité de rapporteur. Merci cher Maître pour le temps consacré à la lecture de cette thèse et pour les suggestions ainsi que les remarques judicieuses que vous m'avez indiquées. Veuillez trouver ici, cher Maître le témoignage de ma grande reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur ACKAH Jacques Auguste Alfred Bognan, Maître de Conférences de Biochimie-Microbiologie à l'Université Jean Lorougnon Guédé de Daloa.

Je voudrais cher Maître vous remercier d'avoir accepté de prendre part au jury de ma thèse pour examiner ce travail. Votre humilité, votre disponibilité et votre ardeur dans le travail font de vous un homme de qualité. Que Dieu vous comble de tout ce que vous aspirez dans la vie quotidienne et dans l'exercice de vos fonctions.

A Madame BOYVIN Lydie, Médecin, Chargée de recherche à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Responsable de l'Unité de Biochimie clinique et d'hémobiologie du Département de Biochimie médicale et fondamentale de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.

Tous les mots ne pourraient exprimer ma grande affection et ma profonde reconnaissance. Votre soutien, votre disponibilité, votre patience, votre compréhension et vos conseils ne m'ont jamais fait défaut Maman ! Merci pour mon apprentissage et votre collaboration tout au long de ces deux stages (Master et Thèse). Merci de m'avoir soutenue, encouragée et aimée. Tout ça n'aurait pas été possible sans vous. Vous vous êtes impliqué jour et nuit et avez passé du temps à me guider dans la méthodologie et une fois ce travail achevé, à relire le manuscrit avec beaucoup d'intérêt afin d'améliorer le contenu malgré vos occupations. Je suis particulièrement fière de vous car vous faites l'honneur des femmes. J'espère ne jamais vous décevoir, ni trahir votre confiance et vos sacrifices. Quoi que je fasse, où que j'aie par la suite, vous continuerez à être dans mon cœur et à être ma mère. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour vous, recevez ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime.

Puisse Dieu Tout-Puissant vous assister davantage dans l'exercice de votre fonction, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur et qu'il vous rende au centuple cet effort déployé.

A FEU BOYVIN Isidore, Professeur Titulaire de Sciences morales.

Papa BOYVIN, je garde un très bon souvenir de vous. Vous n'avez cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes ces années de thèse. Au moment où vous me disiez de faire les préparatifs de ma soutenance, vous nous abandonnez ! Vous resterez pour toujours dans nos cœurs et dans nos mémoires.

Puisse votre âme reposer en paix dans le royaume du Seigneur Jésus-Christ.

A Monsieur YAPI Houphouët Félix, Professeur Titulaire de Biochimie au Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique de l'UFR Biosciences à l'UFHB et Directeur de cabinet du Ministre de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.

Vos conseils et encouragements m'ont toujours fait du bien. Vous m'avez soutenu depuis le début jusqu'au terme de ce travail par vos conseils. Je garderai dans mon cœur votre générosité, vos qualités humaines et scientifiques. Je vous remercie très sincèrement.

Veillez trouver ici, très cher Maître, l'expression de ma profonde gratitude.

A Madame AKE-EDJEME N'Guessan Angèle, Maître de Conférences agrégée de Biochimie au Département de Biochimie et de Biologie moléculaire de l'UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques à l'Université Félix Houphouët-Boigny.

Je vous remercie pour vos remarques pertinentes dans ma formation au Département de Biochimie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Vos précieux conseils m'ont beaucoup aidé à canaliser mes émotions vers l'objectif à atteindre.

Soyez assurée de mon estime et de ma profonde gratitude.

A Monsieur COULIBALY Adama, Professeur Titulaire de Microbiologie et Président de l'Université Gbon Péléforo Coulibaly de Korhogo.

Je tiens à vous remercier pour avoir contribué à ma formation et encouragé à continuer les études jusqu'au Doctorat à l'Université Félix Houphouët-Boigny. Je voudrais vous traduire ma sincère reconnaissance pour la qualité de vos enseignements et votre talent de pédagogue. Je vous prie de trouver ici toute ma gratitude pour vos différents conseils qui m'ont toujours fait du bien.

A Monsieur N'GUESSAN Jean David, Professeur Titulaire de Biochimie-Pharmacologie, Vice-Doyen chargé de la pédagogie de l'UFR Biosciences et Sous-Directeur du Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique de l'UFR Biosciences à l'Université Félix Houphouët-Boigny. Merci pour vos conseils et encouragements. Vos encouragements m'ont beaucoup confortée dans la réalisation de ce travail.

A Monsieur COULIBALY Founzégué Amadou, Maître de Conférences de Biochimie-Pharmacologie au Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique, UFR Biosciences, à l'Université Félix Houphouët-Boigny.

Je tiens à vous remercier pour vos nombreux encouragements. J'ai bénéficié de votre soutien, de votre immense gentillesse, de votre simplicité, de vos qualités humaines, de vos conseils. Trouvez ici le témoignage de ma plus vive reconnaissance.

A Monsieur N'GUESSAN Raymond, Directeur de Recherche à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Chef du Département de Tuberculose de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.

Mes sincères remerciements pour vos conseils, votre soutien et votre collaboration. Je tiens particulièrement à vous remercier d'abord pour m'avoir ouvert les portes de votre laboratoire pour mes travaux de Biologie Moléculaire. Que Dieu vous bénisse ainsi que toute votre famille.

A Monsieur AHONZO Niamké Sébastien, Professeur titulaire de Biochimie et Directeur du Laboratoire de Biotechnologie, UFR Biosciences, à l'Université Félix Houphouët-Boigny.

Durant nos années d'études, nous avons eu la chance de vous avoir comme enseignant et encadreur. Vous nous avez inculqué la discipline, la rigueur et la méthodologie dans le travail. Permettez-moi de vous témoigner mon respect et mon estime les plus sincères.

A Monsieur KAROU Tagro Germain Alfred, Maître de Conférences de Biochimie au Laboratoire de Biotechnologie, UFR Biosciences, à l'Université Félix Houphouët-Boigny.

Merci encore cher "tonton" pour vos sages et précieux conseils et pour les orientations que vous m'avez donnés dans ma carrière de jeune chercheur. Vous n'avez jamais cessé de m'encourager et me motiver à faire un peu plus et à aller le plus loin possible dans les études.

Soyez assuré de mon estime et de ma profonde gratitude.

A Monsieur KRA Adou Koffi Mathieu, Maître de Conférences de Biochimie-Microbiologie au Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique, UFR Biosciences, à l'Université Félix Houphouët-Boigny.

J'ai eu la grande chance de vous avoir comme enseignant, car vous avez suscité en moi le goût de la recherche. Merci pour votre soutien, votre rigueur scientifique et vos qualités humaines.

A Monsieur M'BOH Gervais, Maître de recherche à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Responsable de la plate-forme de Recherche, d'Identification et d'Evaluation Moléculaire (RIEM) de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.

Vous avez toujours pris le temps de répondre à mes questions, en me conseillant avec sincérité. J'ai été touché par la bienveillance et la sympathie avec laquelle tous les deux Dr Meité et vous m'avez accueilli au département de Biochimie. Veuillez recevoir ma profonde gratitude.

A Monsieur MEITE Souleymane, Chargé de recherche à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Responsable de l'Unité de Transport, d'Expédition et de Packaging (UTEPE) de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.

J'ai une pensée particulière pour vous qui m'avez soutenu et encouragé tout au long de mon stage à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Vous avez toujours tenu compte de mes suggestions pour l'avancé du travail. Merci du fond du cœur Docteur.

A Monsieur YAYE Guillaume, Maître-Assistant à l'Université Jean Lorougnon Guédé de Daloa.

Grand-Frère, je tiens à vous remercier particulièrement pour toutes nos discussions et tes conseils qui m'ont accompagnée tout au long de ces années de thèse. Vous avez été très utile, présent et surtout supportée dans tout ce que j'ai entrepris. Que Dieu vous comble de ses grâces.

A Monsieur AKO Ako Aristide Béranger. Chargé de Recherche à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire au Département de Parasitologie Mycologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.

Vos conseils, votre sociabilité et vos compétences en génétique ont été d'un grand apport dans la réalisation de ce document. Veuillez recevoir ma profonde gratitude.

A Monsieur KOUASSI Serge, Maître-Assistant au Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique de l'UFR Biosciences de l'Université Félix Houphouët-Boigny.

Il m'est impossible d'oublier votre aide précieuse pour ma recherche bibliographique et son stockage. Que Dieu vous comble de ses grâces.

A Monsieur PAKORA Gile-Alex, Assistant au Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique de l'UFR Biosciences à l'Université Félix Houphouët-Boigny.

Merci pour vos encouragements. J'ai appris avec vous qu'en travaillant avec acharnement dans la discrétion, l'on peut se surpasser et aboutir à de bons résultats. Merci infiniment!

A Monsieur BIDIE Alain Dit Philippe, Professeur Titulaire de Biochimie-Pharmacologie au Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique de l'UFR Biosciences de l'Université Félix Houphouët-Boigny.

Merci pour vos conseils et votre soutien sans faille.

A Monsieur DJIH Bernard Nazaire, Maitre-assistant au Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique de l'UFR Biosciences à l'Université Félix Houphouët-Boigny.

Vous avez été un modèle pour moi et vos sages conseils m'ont fait beaucoup de bien.

Aux Enseignants-Chercheurs

Je voudrais, à ce stade de mes études, témoigner toute ma gratitude à tous les Enseignants-Chercheurs du Laboratoire de Pharmacodynamie-biochimique de l'UFR Biosciences à l'Université Félix Houphouët-Boigny et ceux de l'Université Jean Lorougnon Guedé de Daloa.

A tout le personnel de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire

J'adresse un grand et chaleureux MERCI à tous les docteurs, techniciens et stagiaires que j'ai eu le plaisir de connaître à l'IPCI, pour la bonne humeur et la convivialité qu'ils ont répandues au quotidien durant toutes ces années de stage.

Au Département de Biochimie médicale et fondamentale

Un grand MERCI à Madame GNON Edwige appelée affectueusement « Maman GNON ». Vous êtes pour moi une grande sœur. Je pense au doyen SAWADOGO Issiaka, SEKA Fiacre, SOMPLEI Michel, KOUASSI Jules, BOUA, DJAMAN Patric, KOUASSI Jean-Philippe, Dr BAH, Dr KOFFI Marc olivier, N'ZI Guy Sylver, AYEKOUE Eric, Dr N'GUESSAN Marie Florence, Dr AKA Edwige, YEO Kadjewéli, Dr DAGNOGO «Le massa», Dr OSSEY Prisca, ALLICO Jean Maurel, DOUDOU Magui, ZOKORE Zazou, N'GUESSAN Jean Luc, DIALLO, Dr OLOYE, Dr ALASSANI Faiza et sans oublier ATCHO Julien « mon cher fils »,

A vous tous qui avez contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, j'aimerais dire merci. Merci pour votre soutien et pour votre collaboration dans cette voie de la recherche que nous menons ensemble. Ce travail est aussi le vôtre!

Aux membres des autres laboratoires avec qui j'ai pu tisser des liens pendant les manipulations au laboratoire

Je tiens particulièrement à remercier KOUI Tosséa Stéphane « Mon Maître » pour son aide et ses très précieux conseils. Vivement MERCI au Doyen KOUAKOU Fofana, DJEHIFE Vicky, EHUI et Mme SECK, .OUMOU , GUEI, SYLVESTRE, Dr YAO Serge Stéphane « l'oncle », GNANGUI Halo Albert, Dr TUO, Dr SEVEDE, Dr DOUMBIA, YAO René, Dr TOTI Abalé, Dr ISSA Mohamad, Dr DIPLO, N'CHOTT Michelle, Dr GADOU Victoire, Mr COULIBALY de l'UGA, Mme KOFFI « ma grande sœur » de l'URAP, le Doyen ABLE... pour la convivialité qu'ils ont répandues au quotidien durant toutes ces années de stage. Je voudrais vous traduire toutes mes reconnaissances et ma joie d'avoir été à vos côtés.

A ma marraine et son époux

Monsieur et Madame DIABATE, Je suis particulièrement fière de vous avoir dans la famille. Vous avez toujours été un bon exemple pour moi. Recevez l'expression de ma profonde gratitude et de mon profond respect. Que Dieu vous assiste d'avantage dans l'exercice de vos fonctions et qu'il vous accorde une très longue vie couronnée par une très bonne santé afin que je puisse m'abreuver à la source de vos connaissances.

A mes amis

KAROU Alice Dorcas, Dr AGGRE Don Josette, Dr DJOUPO Prisca, DJEHA Rosine et Dr DROUCOULA Guillaume Cyril, pour votre soutien durant mes moments de pleurs et de joie. Ne dit-on pas que c'est dans les difficultés qu'on reconnaît ses vrais amis ?
Puisse Dieu vous combler de ses Grâces. Merci pour tout.

A mes connaissances

Je remercie particulièrement DJAMAN Fabien, Flore, OULA Désirée, ETTIEN Roger, Mr AYIRIBI Ebenezer, ATSE Didier, ESSOH Stéphane, BAI Narcisse, Monsieur KOUAME de la scolarité, DANHO Perrine Charlène « ma petite sœur », Monsieur et madame DANHO, KANGA Arsène, Dr KOUAME Yves, Monsieur et madame SANOGO Alidou, Monsieur et madame ADOMON, la famille YEDO, KOUASSI martin, Monsieur et madame ALANBGA, Edwige ATCHO « ma belle-fille » pour leur amitié. Vous étiez toujours présents dans les bons moments comme dans les mauvais tels de véritables amis. Veuillez recevoir mes remerciements pour votre esprit courtois et sociable.

A mes camarades

Je suis très reconnaissant à tous mes camarades du Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique de l'Université Félix Houphouët-Boigny et de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire pour leur aide et leur soutien. J'adresse un grand et chaleureux MERCI à tous les étudiants que j'ai eu le plaisir de côtoyer à l'IPCI, pour la bonne humeur et la convivialité qu'ils ont répandues au quotidien durant toutes ces années de stage et leur rôle dans cette belle aventure humaine .
Par peur d'oublier certains, je ne saurais les citer.

A tous les frères et sœurs de l'Eglise Méthodiste Unie de Côte d'Ivoire pour leur soutien spirituel.

A toutes les personnes vivant avec le VIH

Le chemin déjà parcouru est considérable. Mais, il en reste encore, que Dieu Tout-Puissant vous assister chaque jour. Courage ! On est ensemble !

AVANT-PROPOS

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de la lutte et de la prévention contre l'infection à VIH/sida en Côte d'Ivoire.

En effet, l'infection à virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est un problème de santé publique. Aujourd'hui, de nombreuses molécules antirétrovirales disponibles ont positivement modifié le pronostic de l'infection à VIH. Cependant, les traitements antirétroviraux d'association, dans leurs actions métaboliques, utilisent aussi des micronutriments notamment les vitamines liposolubles, en particulier, la vitamine D₃. Cette vitamine est indispensable pour le bon fonctionnement de l'organisme au cours de l'infection à VIH/sida. A la différence des autres vitamines liposolubles (vitamines A, E et K) qui ont une source alimentaire, la principale source de vitamine D₃ (Calciférol) est le soleil. De plus, la vitamine D₃ assure ses effets biologiques grâce à son récepteur (VDR). L'existence d'un polymorphisme génétique du VDR constituerait donc un facteur important de susceptibilité individuelle aux effets biologiques de la vitamine D₃. En effet, des études ont montré que le déficit en vitamine D₃ observé chez les patients VIH positifs pourrait être lié à des mutations au niveau du récepteur de la vitamine D (VDR).

Cette lutte contre l'infection à VIH nous oblige donc à accorder davantage d'attention aux micronutriments, en l'occurrence la vitamine D₃ ainsi qu'à son récepteur.

Cette étude a été réalisée dans différents laboratoires, que sont le Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique de l'Unité de Formation et de Recherche (UFR) de Biosciences de l'Université Félix Houphouët-Boigny (UFHB) et le Département de Biochimie médicale et fondamentale de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI). Au cours de cette étude, la population adulte dont l'âge varie entre 18 et 49 ans a été ciblée, car elle constitue la population la plus exposée à l'infection à VIH sous traitements antirétroviraux selon les études menées en Côte d'Ivoire. Nous espérons que les résultats de nos travaux contribueront à l'amélioration de la prise en charge des PVVIH.

TABLE DES MATIERES

	PAGES
DEDICACES	II
REMERCIEMENTS	V
AVANT-PROPOS	XIV
TABLE DES MATIERES	XVI
LISTE DES ABREVIATIONS	XXII.
LISTE DES FIGURES	XXVI
LISTE DES TABLEAUX	XXIX
LISTE DES ANNEXES	XXXII
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	7
I. INFECTION A VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE	8
I.1. VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE	8
I.1.1. Historique et description	8
I.1.2. Cycle de réplication	10
I.1.3. Epidémiologie	13
I.1.4. Modes de transmission	14
I.2. SYMPTOMATOLOGIE DE L'INFECTION A VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE	14
I.3. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE.....	15
I.3.1. Diagnostic sérologique.....	15
I.3.2. Détermination de la charge virale	16
I.3.3. Comptage des lymphocytes T CD4+.....	16
I.4. TRAITEMENT CURATIF ET PREVENTION.....	16
I.4.1.Traitement curatif antirétroviral.....	16
I.4.2. Prévention.....	19
II. SANG	19
II.1. DEFINITION ET CONSTITUANTS DU SANG	19
II.1.1. Cellules du sang.....	19
II.1.2. Plasma.....	20
II.2. CELLULES MONONUCLEES DU SANG PERIPHERIQUE	20
II.2.1. Définition	20
II.2.2. Classification, rôles et fonctions	20
III. MICRONUTRIMENTS	21
III.1. MINERAUX	21

III.2. VITAMINES	22
III.2.1. Vitamine D	22
III.2.1.1. Métabolisme de la vitamine D ₃	23
III.2.1.2. Régulation du métabolisme de la vitamine D ₃	25
III.2.1.3. Vitamine D ₃ et ses fonctions biologiques	26
III.2.1.4. Vitamine D ₃ et pathologies.....	38
III.2.1.5. Différentes méthodes de dosage de la 25-Hydroxyvitamine D ₃	40
IV. PARATHORMONE	43
IV.1. DEFINITION, ORIGINE, STRUCTURE ET METABOLISME.....	43
IV.1.1. Définition, origine et structure.....	43
IV.1.2. Métabolisme.....	44
IV.2. ROLES BIOLOGIQUES DE LA PARATHORMONE	46
IV.2.1. Au niveau du rein	46
IV.2.2. Au niveau de l'intestin	48
IV.2.3. Au niveau de l'os	48
IV.3. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA PARATHORMONE.....	48
IV.4. INFECTION A VIH ET PARATHORMONE	49
V. GENERALITES SUR LES RECEPTEURS NUCLEAIRES.....	49
V.1. RECEPTEUR NUCLEAIRE DE LA VITAMINE D.....	50
V.1.1. Identification et structure du Récepteur de la vitamine D.....	51
V.1.2. Mode d'action et rôle biologique du Récepteur de la vitamine D.....	53
V.1.3. Régulation de l'activité du Récepteur de la vitamine D.....	54
V.1.4. Récepteur de la vitamine D et système immunitaire	54
V.2. POLYMORPHISMES DES SEQUENCES DU RECEPTEUR DE LA VITAMINE D.....	54
V.3. MUTATIONS AFFECTANT LES SEQUENCES DU RECEPTEUR DE LA VITAMINE D AU COURS DE L'INFECTION A VIH.....	58
VI. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	59
VI.1. METHODES D'EXTRACTION DE L'ADN GENOMIQUE DES CELLULES MONONUCLEES DU SANG PERIPHERIQUE	59
VI.1.1. Méthode Phénol-Chloroforme.....	59
VI.1.2. Salt-out ou méthode de relargage.....	60
VI.1.3. Kits d'extraction.....	60

VI.2. QUANTIFICATION ET CONSERVATION DE L'EXTRAIT D'ADN.....	60
VI.3. AMPLIFICATION <i>IN VITRO</i> DU MATERIEL GENETIQUE.....	61
VI.4. SEQUENÇAGE DE L'ADN	62
VI.5. OUTILS BIOINFORMATIQUES D'ANALYSE.....	62
MATERIEL ET METHODES	64
I. POPULATION D'ETUDE.....	65
I.1. CADRE D'ETUDE ET TAILLE DE L'ECHANTILLON.....	65
I.2. CRITERES DE SELECTION DES SUJETS.....	65
I.2.1. Critères d'inclusion des patients et des témoins.....	65
I.2.2. Critères de non inclusion des patients et des témoins	66
I.3. ASPECT ETHIQUE	66
II. MATERIEL	66
II.1. MATERIEL BIOLOGIQUE	66
II.2. MATERIEL TECHNIQUE ET REACTIFS.....	67
II.2.1. Appareillages utilisés.....	67
II.2.2. Réactifs.....	68
II.3. SEQUENCES DES GENES DU VDR A AMPLIFIER ET OLIGONUCLEOTIDES	69
III. METHODES	74
III.1. DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DU VIH	74
III.1.1. Détection des anticorps anti - VIH par le test rapide de type DETERMINE.....	74
III.1.2. Détection des anticorps anti-VIH par le test rapide de type SD-Bioline VIH-1/2....	76
III.1.3. Détection des anticorps anti - VIH par le test rapide de type STAT-PAK.....	77
III.2. NUMERATION DES LYMPHOCYTES T CD4 ⁺	77
III.3. DOSAGE DES PARAMETRES BIOCHIMIQUES	78
III.4. DOSAGE DE LA PARATHORMONE	78
III.5. DOSAGE DE LA VITAMINE D ₃	80
III.5.1. Extraction des lipides sériques contenant la vitamine D ₃	80
III.5.2. Dosage de la 25-hydroxyvitamine D ₃	81
III.6. EXTRACTION DE L'ADN GENOMIQUE DES CELLULES MONONUCLEES HUMAINES.....	82
III.6.1. Extraction des cellules mononucléées	82
III.6.2. Extraction de l'ADN génomique au kit QIAGEN.....	83
III.7. AMPLIFICATION DES SEQUENCES D'INTERET DE L'ADN DU VDR.....	85

III.7.1. Réalisation de la réaction de polymérisation en chaîne.....	86
III.7.2. Electrophorèse des produits de la PCR.....	87
III.7.3. Purification des produits de la PCR et leurs séquençages.....	88
III.8. METHODES D'ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS	89
RESULTATS ET DISCUSSION	90
I. RESULTATS	91
I.1. CARACTERISTIQUES EPIDEMIOLOGIQUES DE LA POPULATION D'ETUDE.....	91
I.2. PROFIL BIOCHIMIQUE DE LA POPULATION D'ETUDE.....	91
I.3. STATUT EN 25-HYDROXYVITAMINE D ₃ ET EN PARATHORMONE DE LA POPULATION D'ETUDE.....	91
I.3.1. Chromatogrammes du standard de 25-hydroxyvitamine D ₃ et des sérums des sujets.....	91
I.3.1.1. Chromatogramme du standard de la 25-hydroxyvitamine D ₃	91
I.3.1.2. Chromatogrammes des sérums des sujets.....	91
I.3.2. Concentrations moyennes en 25-hydroxyvitamine D ₃ et en parathormone de la population d'étude	96
I.3.3. Répartition de la population d'étude selon le statut en 25-hydroxyvitamine D ₃ et en parathormone	96
I.3.4. Statut en vitamine D ₃ et parathormone de la population d'étude selon le taux de lymphocytes T CD4+.....	99
I.3.5. Statut en 25-hydroxyvitamine D ₃ et en parathormone selon l'âge.....	99
I.3.6. Statut en 25-hydroxyvitamine D ₃ et en parathormone selon la combinaison thérapeutique utilisée.....	102
I.3.7. Statut en 25-hydroxyvitamine D ₃ et en parathormone selon le sexe des patients traités et le type de combinaison antirétrovirale.....	102
I.3.8. Statut en 25-hydroxyvitamine D ₃ et en parathormone selon l'âge et le taux de lymphocytes T CD4+ et le type de combinaison antirétrovirale.....	105
I.4. POLYMORPHISME DU GENE DU RECEPTEUR DE LA VITAMINE D.....	110
I.4.1. Résultats de la PCR des fragments d'ADN d'intérêt.....	110
I.4.2. Polymorphismes Fok-1, Bsm-1, Apa-1 et Taq-1 du gène du récepteur de la vitamine D.....	110
I.4.3. Génotypage du gène du VDR.....	115

I.4.4. Analyse du polymorphisme du gène du VDR.....	117
I.4.4.1. Distributions allélique et génotypique des échantillons d'étude.....	117
I.4.4.1.1. Prévalences allélique et génotypique de Fok-1.....	117
I.4.4.1.2. Prévalences allélique et génotypique de Bsm-1.....	117
I.4.4.1.3. Prévalences allélique et génotypique d'Apa-1.....	120
I.4.4.1.4. Prévalences allélique et génotypique de Taq-1.....	120
I.4.4.1.5. Distribution des différents types de combinaisons de polymorphisme mononucléotidique (SNP) des échantillons de la population d'étude.....	120
I.4.4.2. Distributions allélique et génotypique des séquences de VDR selon le statut en vitamine D ₃	124
I.4.4.2.1. Statut en vitamine D ₃ et prévalences allélique et génotypiques de Fok-1.....	124
I.4.4.2.2. Statut en vitamine D ₃ et prévalences allélique et génotypique de Bsm-1.....	124
I.4.4.2.3. Statut en vitamine D ₃ et prévalences allélique et génotypique de Apa1.....	127
I.4.4.2.4. Statut en vitamine D ₃ et prévalences allélique et génotypique de Taq-1.....	127
I.4.4.3. Prévalences allélique et génotypique du gène du VDR des échantillons de PVVIH déficients et insuffisants en 25 (OH) D ₃ selon le taux de CD4+.....	127
I.4.4.3.1. Prévalences allélique et génotypique de Fok-1 et PVVIH déficients et insuffisant en 25 (OH) D ₃ selon le taux de CD4+.....	127
I.4.4.3.2. Prévalences allélique et génotypique de Bsm-1 et PVVIH déficients et insuffisants en 25 (OH) D ₃ selon le taux de CD4+.....	132
I.4.4.3.3. Prévalences allélique et génotypique d'Apa-1 et PVVIH déficients et insuffisants en 25 (OH) D ₃ selon le taux de CD4+.....	132
I.4.4.3.4. Prévalences allélique et génotypique de Taq-1 et PVVIH déficients et insuffisant en 25 (OH) D ₃ selon le taux de CD4+.....	132
I.4.4.4. Distribution des différents types de polymorphisme mononucléotidique (SNP) selon le statut en 25 (OH) D ₃ des échantillons de PVVIH.....	132
II. DISCUSSION.....	140
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	151
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	153
ANNEXES	A

LISTE DES ABREVIATIONS

1,25 (OH) ₂ D ₃	: 1,25-dihydroxyvitamine D ₃ ou Calcitriol
25 (OH) D ₃	: 25-hydroxyvitamine D ₃ ou Calcidiol
3TC	: 2',3'-didéoxy-3'-thiacytidine (Lamivudine)
A	: Adénine
ABC	: Abacavir
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ALAT	: Alanine aminotransférase
AMPC	: Adénosine MonoPhosphate cyclique
ARN	: Acide Ribonucléique
ARNm	: Acide Ribonucléique messenger
ART	: Traitements Antirétroviraux
ARV	: Antirétroviraux
ATP	: Adénosine Triphosphate
ATV	: Atazanavir
AZT	: Azidothymidine (Zidovudine)
C	: Cytosine
CCR5	: C-C motif chemokines récepteur 5
CD4	: Cluster de différenciation 4
CDC	: Centres de Control et de prévention des maladies
CLHP	: Chromatographie liquide de haute performance (HPLC)
CMSP	: Cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC)
CXCR4	: C-X-C motif chemokines receptor 4
CYP	: Cytochrome P450
DBP	: Vitamin D Binding Protein
DMSO	: Diméthylsulfoxyde

ECaC	: Canal épithélial calcique
EDTA	: Ethylène Diamine Tétracétique Acide (Acid Diamine Ethylene Tetra Acetic)
EFV	: Efavirens
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
ERO	: Espèces réactives de l'oxygène
FGF 23	: Fibroblastique Growth Factor 23
FTC	: Emtricitabine
G	: Guanine
gp120	: glycoprotéine 120
gp41	: glycoprotéine 41
HPLC	: High-Performance Liquid Chromatography
IFN- γ	: Interféron gamma
IL	: Interleukine
INNTI	: Inhibiteur non-nucléosidique de la transcriptase inverse
INTI	: Inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse
IP	: Inhibiteur de la protéase
IPCI	: Institut Pasteur de Côte d'Ivoire
LBD	: Ligand Binding Domain
LPV/r	: Lopinavir/ritonavir
NF-K β	: Nuclear factor-Kappa b
NFS	: Numération Formule Sanguine
NK	: Natural Killer
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
ONUSIDA	: Organisation des Nations Unies pour le sida
PBMC	: Peripheral blood mononuclear cell

PTH	: Parathormone
PVVIH	: Personne Vivant avec le Virus de l'Immunodéficience Humaine
PXR	: Pregnane X Récepteur
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute medium
RXR	: Retinoïd X Receptor
SIDA	: Syndrôme de l'immunodéficience acquise
SIV	: Simian Immunodeficiency Virus
SNP	: Polymorphisme mononucléotide
SVF	: Sérum de veau fœtal
T CD4+	: Lymphocytes T CD4 activés
T	: Thymine
TDF	: Tenofovir ou disoproxil fumarate
TLR	: Toll Like Receptor
TNF	: Tumor necrosis factor
UI	: Unité Internationale
UV	: Ultraviolet
VDR	: Vitamin D Receptor (Récepteur de la Vitamine D)
VDRE	: Vitamin D Receptor Element (Vitamine D élément de réponse)
VIH	: Virus de l'Immunodéficience Humaine
WHO	: World Health Organization
WHO/UNAIDS	: World Health Organization and United Nations Programme on HIV/AIDS

LISTE DES FIGURES

Figure 1:	Structure du VIH.....	9
Figure 2:	Structure du génome du VIH.....	11
Figure 3:	Cycle de réplication du VIH.....	12
Figure 4:	Cibles des antirétroviraux.....	17
Figure 5:	Métabolisme de la vitamine D	24
Figure 6:	Régulation du métabolisme de la vitamine D ₃ par les hormones.....	27
Figure 7:	Vitamine D et régulation de l'homéostasie phosphocalcique.....	28
Figure 8:	Voies de signalisations non génomique et génomique de la forme active de la vitamine D ₃	34
Figure 9:	Métabolisme de la vitamine D ₃ dans les cellules du système immunitaire humain.....	36
Figure 10:	Multiples fonctions de la vitamine D ₃	41
Figure 11:	Biosynthèse de la parathormone.....	45
Figure 12:	Action de la parathormone au niveau des différents organes.....	47
Figure 13:	Domaines fonctionnels du Récepteur de la vitamine D (VDR).....	52
Figure 14:	Sites des polymorphismes principaux du gène codant pour le VDR.....	56
Figure 15:	Séquences nucléotidiques d'intérêt provenant du gène complet du récepteur de la vitamine D (VDR) Humain.....	71
Figure 16:	Tests rapides utilisés pour la détection des anticorps anti-VIH.....	75
Figure 17:	Tracé chromatographique des standards de Rétinyl acétate et de la 25 (OH) D ₃ (25-hydroxyvitamine D ₃)	94
Figure 18:	Tracé chromatographique de la 25 (OH) D ₃ sérique de témoin VIH négatif et de patient VIH positif.....	95
Figure 19:	Statut en 25-hydroxyvitamine D ₃ (a) et en parathormone (b) des patients infectés par le VIH selon le taux de Lymphocytes T CD4+.....	100
Figure 20:	Concentrations de 25 (OH) D ₃ (a) et PTH (b) des patients infectés de sexe féminin sous ARV.....	104
Figure 21:	Concentrations de 25 (OH) D ₃ (a) et PTH (b) des patients infectés de sexe masculin sous ARV.....	107
Figure 22:	Migration des amplicons Fok-1 (Exon 2).....	111
Figure 23:	Migration des amplicons Bsm-1 (intron 8).....	112
Figure 24:	Migration des Amplicons Apa-1 (Intron 8).....	113
Figure 25:	Migration des amplicons Taq-1 (Exon 9).....	114

Figure 26:	Prévalence génotypique de Fok-1 des PVVIH et des témoins.....	118
Figure 27:	Répartition des échantillons d'étude selon le type de combinaison de polymorphisme mononucléotidique (SNP) gène du VDR.....	123
Figure 28:	Génotypes de Fok-1 des échantillons de PVVIH selon le statut en 25 (OH) D ₃ et le taux de CD4+.....	131
Figure 29:	Génotypes de Bsm-1 des échantillons de PVVIH selon le statut en 25 (OH) D ₃ et le taux de CD4+.....	134
Figure 30:	Génotypes de Apa-1 des échantillons de PVVIH selon le statut en 25 (OH) D ₃ et le taux de CD4+.....	136
Figure 31:	Génotypes de Taq-1 des échantillons de PVVIH selon le statut en 25 (OH) D ₃ et le taux de CD4+.....	138
Figure 32:	Répartition des différents types de polymorphisme mononucléotidique (SNP) du gène du VDR des échantillons de PVVIH en fonction du statut en 25 (OH) D ₃	139

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I :	Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour amplifier les différents fragments d'ADN du VDR.....	72
Tableau II :	Conditions d'amplification des fragments d'intérêt d'ADN du VDR.....	73
Tableau III :	Valeurs normales de référence des marqueurs biochimiques recherchés.....	79
Tableau IV :	Répartition de la population d'étude en fonction du sexe et de la moyenne d'âge.....	92
Tableau V :	Valeurs moyennes des paramètres biologiques de la population d'étude.....	93
Tableau VI :	Valeurs moyennes des 25 (OH) D ₃ et de PTH de la population d'étude.....	97
Tableau VII :	Répartition de la population d'étude selon le statut en 25 (OH) D ₃ et en Parathormone.....	98
Tableau VIII :	Statut en 25-hydroxyvitamine D ₃ et en parathormone de la population d'étude selon l'âge.....	101
Tableau IX :	Répartition et concentrations de 25 (OH) D ₃ et de PTH de la population sous antirétroviraux.....	103
Tableau X :	Concentrations de 25 (OH) D ₃ pour chaque tranche d'âge, pour le taux de TCD4+ et combinaison thérapeutique.....	108
Tableau XI :	Concentrations de PTH pour chaque tranche d'âge, pour le taux de TCD4+ et combinaison thérapeutique.....	109
Tableau XII :	Codons de l'analyse du séquençage.....	116
Tableau XIII :	Distribution des allèles et mutations de Fok-1 (rs 2228570) de l'exon 2 du gène du VDR des échantillons d'étude.....	118
Tableau XIV :	Distribution allélique et génotypique de Bsm-1 (rs 1544410) de l'intron 8 du gène du VDR des échantillons d'étude	119
Tableau XV :	Distribution allélique et génotypique d'Apa-1 (rs 7975232) de l'intron 8 du gène du VDR des échantillons d'étude	121
Tableau XVI :	Distribution allélique et génotypique de Taq-1 (rs 731236) de l'exon 9 (codon 352) du gène du VDR des échantillons d'étude	122
Tableau XVII :	Polymorphisme Fok-1 (rs 2228570) selon le statut en vitamine D ₃	125
Tableau XVIII :	Polymorphisme Bsm-1 (rs 1544410) selon le statut en vitamine D ₃	126
Tableau XIX :	Polymorphisme Apa-1 (rs 7975232) selon le statut en vitamine D ₃	128
Tableau XX :	Polymorphisme Taq-1 (rs 731236) selon le statut en vitamine D ₃	129

Tableau XXI :	Statut en vitamine D ₃ et prévalence du polymorphisme Fok-1 (rs 2228570) selon le taux de CD4+ des échantillons de PVVIH déficients et insuffisants en 25 (OH) D ₃	130
Tableau XXII :	Statut en vitamine D ₃ et prévalence du polymorphisme Bsm-1 (rs 1544410) selon le taux de CD4+ des échantillons de PVVIH déficients et insuffisants en 25 (OH) D ₃	133
Tableau XXIII :	Statut en vitamine D ₃ et prévalence du polymorphisme Apa-1 (rs 7975232) selon le taux de CD4+ des échantillons de PVVIH déficients et insuffisants en 25 (OH) D ₃	135
Tableau XXIV :	Statut en vitamine D ₃ et prévalence du polymorphisme Taq1 (rs 731236) selon le taux de CD4+ des PVVIH déficients et insuffisants en 25 (OH) D ₃	137

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 :	Evolution des paramètres virologique et immunologique au cours de l'infection à VIH.....	B
Annexe 2 :	Classes des Antirétroviraux.....	C
Annexe 3 :	Les composants cellulaires du système immunitaire.....	D
Annexe 4 :	Cellules participant à la défense immunitaire de l'organisme humain.....	E
Annexe 5 :	Structure du Cholécalférol (D ₃) et de l'ergocalciférol (D ₂).....	F
Annexe 6 :	Mécanismes de l'immunomodulation de la vitamine D ₃	G
Annexe 7 :	Chaîne HPLC (Waters [®] , France).....	H
Annexe 8 :	Structure de la PTH	I
Annexe 9 :	Notice d'information, formulaire de consentement et questionnaire de santé.....	J
Annexe 10 :	Cytomètre en flux (BD FACSCalibur)	O
Annexe 11 :	Cobas C311 (Roche, France).....	P
Annexe 12 :	Algorithmes de tests rapides en Série en Côte d'Ivoire.....	Q
Annexe 13 :	Stades cliniques de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et (CDC).....	R
Annexe 14 :	Droite d'étalonnage de la 25-hydroxyvitamine D ₃	S
Annexe 15 :	Séparation des cellules mononucléées sur gradient de Ficoll.....	T
Annexe 16 :	Micro-ondes (Modèle SHARP)	U
Annexe 17 :	Plateau de coulée	V
Annexe 18 :	Cuve de migration (modèle MP-300V BIOCROM)	W
Annexe 19 :	Hotte PSM III Advance [®] (poste de sécurité microbiologique III).....	X
Annexe 20 :	Thermocycleur (Applied Biosystems, 2720 ThermalCyber, Singapore).....	Y
Annexe 21 :	Séquence d'ADN génomique de référence du VDR humain dans le sens 5' vers 3' (NCBI rs NG_008731.1).....	Z
Annexe 22 :	Positions des mutations sur les fragments d'ADN du gène du VDR analysés.....	EE
Annexe 23 :	Les abréviations d'une lettre et de trois lettres pour chaque acide aminé et leur correspondance aux codons ADN.....	FF
Annexe 24 :	Résultats de l'analyse des séquences d'ADN de la population d'étude.....	GG

INTRODUCTION

L'infection à virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est une pandémie (**WHO, 2017**). Environ 36,7 millions de personnes vivent avec le VIH dans le monde (1,8 million de nouvelles infections) dont 25,6 millions en Afrique (**WHO, 2017**). En Afrique subsaharienne, le taux de prévalence du VIH chez les jeunes femmes est plus du double de celui des hommes (**UNAIDS, 2013a**) et une mortalité précoce élevée est rapportée chez les patients commençant un traitement antirétroviral (**Lawn et al., 2008**). En Côte d'Ivoire, le taux de prévalence est passé de 3,4 % en 2012 (**UNAIDS, 2013b**) à 2,7 % en 2016 (**ONUSIDA, 2016**).

Le virus de l'immunodéficience humaine infecte principalement les lymphocytes T CD4+, les monocytes et les macrophages (**Sattentau et Stevenson, 2016 ; Bracq et al., 2018**). Ces différentes cellules, une fois infectées, produisent de nombreuses cytokines et espèces réactives oxygénées (EROs), responsables d'une inflammation chronique chez les individus séropositifs, provoquant ainsi, la mort cellulaire par apoptose des lymphocytes T CD4+ (**Pasupathi et al., 2009**). Au cours de l'infection, le VIH utilise des nutriments, notamment les micronutriments de l'organisme, pour sa réplication et il s'en suit un stress oxydatif mitochondrial dû à la surproduction de radicaux libres dans l'organisme (**Reiche et Simão, 2011 ; Shin et al., 2012**). Les radicaux libres (HO·) et les cytokines (TNF- α , IL-1 et IL-6) ainsi produits stimulent l'expression du virus en activant la transcription du facteur nucléaire NF-kappa B présent dans les cellules de la lignée T et les macrophages (**Israel et al., 1992 ; Zhang, 2009 ; Couret et Chang, 2016**). Ces phénomènes entraînent la réplication du VIH et l'établissement de l'immunodéficience (**Suresh et al., 2009 ; Masiá et al., 2016**) conduisant à la maladie du sida en l'absence de traitement antirétroviral (**Wilson et Sereti, 2013**). En effet, la trithérapie antirétrovirale (ARV) a positivement modifié le pronostic de l'infection à VIH (**Santos et Almeida, 2013**). Cependant, ces traitements causent à long terme des dommages métaboliques avec risque de toxicité rénale, hépatique, lipidique, mitochondriale, hématologique, de diminution de la densité minérale osseuse, et d'ostéomalacie (**WHO, 2013**). De plus, certaines molécules antirétrovirales comme les inhibiteurs de la protéase (IP) et certains inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) se sont avérés nocives et sont responsables de complications métaboliques (**Kotler, 1998**).

Par ailleurs, les traitements antirétroviraux d'association, dans leurs actions métaboliques, utilisent aussi des micronutriments entraînant un effet négatif particulièrement sur la concentration de la vitamine D (**Allavena et al., 2012 ; Havers et al., 2014a**) et de la vitamine B-12 (**Paltiel et al., 1995 ; Woods et al., 2003**).

Les micronutriments, c'est à dire les vitamines et les minéraux sont essentiels à la santé humaine et à la croissance (**Best et al., 2011 ; Celep et al., 2017**). Ces micronutriments,

notamment les vitamines sont indispensables au bon fonctionnement de l'organisme. Les vitamines sont classées en deux groupes dont les vitamines hydrosolubles notamment la vitamine C et toutes les vitamines B et les vitamines liposolubles comme les vitamines A, D, E et K (**Dorosz, 2004**).

A la différence des autres vitamines liposolubles qui ont une source alimentaire, la principale source de vitamine D (Calciférol) est cutanée grâce aux rayons solaires ultra-violet (Muller et Kappes, 2007 ; Gil *et al.*, 2018). La vitamine D est une hormone stéroïdienne liposoluble circulante dont l'origine endogène constitue la voie majoritaire des apports en vitamine D₃ pour l'organisme (Morrison *et al.*, 2011 ; Falchetti *et al.*, 2016). La vitamine D₃ existe sous deux formes qui sont la 25-hydroxyvitamine D₃ (25 (OH) D₃), la forme de réserve ou de stockage, et la 1,25-dihydroxyvitamine D₃ (1,25 (OH)₂ D₃), la forme active (Souberbielle *et al.*, 2008 ; Wuerzner et Waeber, 2011).

Le principal rôle de la vitamine D₃ est la régulation de l'homéostasie du calcium et du phosphate (Holick, 2007 ; Schuch *et al.*, 2013). Cependant, elle régule aussi plusieurs fonctions biologiques (Ghosn et Viard 2013), en agissant sur le métabolisme osseux, sur les glandes parathyroïdiennes, les reins et l'intestin. Elle contrôle la prolifération et la différenciation cellulaire (Holick, 2007 ; Chaves *et al.*, 2014).

La vitamine D₃ assure ces effets biologiques grâce à son récepteur (VDR), appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires (NR) (Ogunkolade *et al.*, 2002 ; Larriba *et al.*, 2013). Le VDR forme toujours un hétérodimère avec le récepteur rétinol X (RXR) (Handel *et al.*, 2013 ; Hossein-Nezhad *et al.*, 2014). Il a deux unités fonctionnelles principales, à savoir le domaine N-terminal de liaison à l'ADN à doigts de zinc et le domaine C-terminal de liaison du ligand (Haussler *et al.*, 2008). Il est aussi composé d'une région 5'UTR du promoteur du gène, d'une région de codage et d'une région 3'UTR (Ručević *et al.*, 2009). Les VDR sont présents dans plus de 30 tissus, y compris ceux de l'intestin, des reins, des os, du cerveau, de l'estomac, du cœur, du pancréas, de la peau, du côlon, de l'ovaire, du sein et de la prostate. Ils sont aussi rencontrés dans les cellules mononuclées du sang périphérique (Nieto *et al.*, 2004 ; Gichuhi *et al.*, 2014) comme les monocytes, les cellules dendritiques, les macrophages, les lymphocytes T et les lymphocytes B (de la Torre *et al.*, 2008 ; Małodobra-Mazur *et al.*, 2012). De ce fait, le VDR représente donc une cible thérapeutique importante dans le traitement de divers troubles (Belorusova et Rochel, 2016).

L'insuffisance en vitamine D₃ est un problème de santé publique. En effet, environ un milliard de personnes dans le monde souffrent de carence ou d'insuffisance en vitamine D₃, soit près de 15 % de la population mondiale (Holick, 2007 ; Kim et Jay, 2017). Ce fait est d'autant

plus marquant que même les individus habitant dans des régions très ensoleillées sont également concernés (Nair et Maseeh, 2012). De plus, alors qu'il existe une abondance de données sur la vitamine D ailleurs dans le monde, le nombre d'études provenant d'Afrique est limité (van Schoor et Lips, 2011 ; Edwards *et al.*, 2014).

L'insuffisance en vitamine D₃ intervient dans les complications de l'ostéoporose, des maladies cardiovasculaires (Souberbielle *et al.*, 2010 ; Júnior *et al.*, 2018), de la résistance à l'insuline (Lake et Adams, 2011), de l'insuffisance rénale, des cancers et du dysfonctionnement immunitaire (Valdivielso et Fernandez, 2006 ; Pirotte *et al.*, 2013 ; Duplancic *et al.*, 2013). Dans le tissu hématopoïétique, la carence en vitamine D₃ provoque une anémie et une diminution cellulaire de la moelle osseuse (Brown *et al.*, 1999 ; Holick, 1999). Ainsi, l'existence d'un polymorphisme génétique du VDR pourrait constituer également un facteur important de susceptibilité individuelle aux effets biologiques de la vitamine D₃ (Uitterlinden *et al.*, 2004b). L'analyse du gène codant le VDR dans des régions codantes ou non, a montré qu'il peut y avoir une substitution de bases par un nucléotide appelée Single Nucleotide Polymorphism (SNP). En effet, plusieurs polymorphismes du gène du VDR ont été identifiés pouvant influencer les concentrations sériques de vitamine D₃ (Köstner *et al.*, 2009). Ainsi, les polymorphismes du VDR les plus fréquemment analysés correspondent aux sites de clivage d'endonucléases *Fok-1* pour l'exon 2, *Bsm-1* pour l'intron 8, *Apa-1* pour l'intron 8 et *Taq-1* pour l'exon 9 (Ručević *et al.*, 2009).

En général, les patients infectés par le VIH ont une déficience en 25-hydroxyvitamine D₃ (25 (OH) D₃) (Pirotte *et al.*, 2013 ; Ghosn et Viard 2013 ; Klassen *et al.*, 2016). Le déficit en vitamine D₃ pourrait être lié à des mutations au niveau de son récepteur (VDR) (Beard *et al.*, 2011). Selon Nieto *et al.* (2004), les polymorphismes du gène du VDR contribuent à la progression de la maladie chez des patients vivant avec le VIH.

En Côte d'Ivoire, au cours d'une étude menée sur le statut phosphocalcique des personnes vivant avec le VIH (PVVIH), il s'est avéré que ceux-ci sont sujets à des perturbations du métabolisme phosphocalcique (Boyvin *et al.*, 2017). Le statut phosphocalcique est un paramètre important dans l'appréciation du statut de la 25-hydroxyvitamine D₃ (25 (OH) D₃) au cours de l'infection à VIH. De plus, des données ont montré qu'une carence sévère en vitamine D est associée à un risque accru de progression de la maladie et de la mortalité liées au VIH (Havers *et al.*, 2014b). Etant donné que le métabolisme de la vitamine D et celui de la parathormone sont liés (Sai *et al.*, 2011), il est aussi important de connaître le statut en parathormone au cours de l'infection à VIH. Par ailleurs, le complexe de signalisation VDR-1,25 (OH)₂ D₃ joue un rôle important dans l'activité biologique de la vitamine D₃ (Pawlowska

et al., 2016). En effet, le récepteur de la vitamine D (VDR) intervient dans les effets immuno-modulateurs de la vitamine D₃ (White, 2008 ; Malodobra-Mazur *et al.*, 2012). Aussi, de nombreuses études ont-elles rapporté une mortalité précoce élevée chez les patients commençant un traitement antirétroviral en Afrique subsaharienne (Lawn *et al.*, 2008). Cependant, en Côte d'Ivoire, malgré les concentrations insuffisantes en vitamine D relevées chez des personnes vivant avec le VIH par Boyvin *et al.* (2017), aucune étude moléculaire sur le récepteur de la vitamine D (VDR) n'a été faite chez celles-ci. Il serait donc important de mener des études sur les concentrations de la 25-hydroxyvitamine D₃ (25 (OH) D₃) en relation avec son récepteur (VDR). Ceci permettra de mieux comprendre le déficit en vitamine D₃ rencontré chez des patients ivoiriens infectés par le VIH, et voir ainsi le niveau d'implication des variations au niveau du gène codant pour le VDR dans la progression de la maladie.

L'objectif général est d'analyser le polymorphisme allélique du VDR en relation avec les concentrations en 25-hydroxyvitamine D₃ pour le déficit en vitamine D₃ afin d'une meilleure prise en charge des personnes vivant avec le VIH (PVVIH).

Les objectifs spécifiques ont été de :

- 1- Déterminer le statut en 25-hydroxyvitamine D₃ et en parathormone des patients VIH positif avec ou sans traitement antirétroviral comparativement à des témoins VIH négatif ;
- 2- Décrire le polymorphisme allélique de 4 régions spécifiques du gène du récepteur (VDR) ;
- 3- Analyser l'association entre le polymorphisme du gène VDR de la vitamine D, les concentrations en 25-hydroxyvitamine D₃ et le degré de l'immunodépression.

En plus de l'introduction, le mémoire est structuré en trois grandes sections. La première section est consacrée à la revue bibliographique qui est subdivisée en six parties : les généralités sur l'infection à VIH, le sang et ses constituants particulièrement, les cellules mononucléées, les micronutriments, c'est-à-dire les minéraux et les vitamines, la parathormone, principalement son métabolisme et ses rôles biologiques, les généralités des récepteurs nucléaires, notamment le récepteur de la vitamine D et les polymorphismes affectant les séquences du récepteur de la vitamine D au cours de l'infection à VIH, enfin, les techniques de biologie moléculaire.

La deuxième section concerne le matériel et les méthodes. Cette section renferme trois (3) grandes parties : la population d'étude, le matériel d'étude (c'est-à-dire le matériel biologique, le matériel technique et les réactifs), les méthodes utilisées pour le dosage des paramètres biochimiques, les études de biologie moléculaire sur l'ADN génomique du VDR

des cellules monoclées humaines et pour l'analyse statistiques des données. La troisième section se rapporte aux résultats et à la discussion relative aux caractéristiques épidémiologiques, au profil biochimique, au statut en 25-hydroxyvitamine D₃ et en parathormone de la population d'étude, ainsi qu'au polymorphisme du gène du récepteur de la vitamine D des échantillons d'étude. Une conclusion générale assortie de perspectives complète cette thèse. La conclusion est la synthèse des résultats majeurs tirés de la troisième section. Des recommandations et des recherches ultérieures formulées en perspectives sont libellées pour l'amélioration de la prise en charge des personnes vivant avec le VIH (PVVIH) en Côte d'Ivoire.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. INFECTION A VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE

I.1. VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE

I.1.1. Historique et description

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) a été isolé en 1983 par l'équipe du professeur Luc Montagnier à l'Institut Pasteur de Paris. Le virus apparaît en microscopie électronique comme une particule sphérique de 80 à 120 nanomètres de diamètre. Il est relativement fragile car détruit par la chaleur à 60 °C et par les antiseptiques, entre autres, l'alcool, l'eau de Javel, etc. Parasite obligatoire, il ne peut survivre plus de 5 à 6 heures hors d'une cellule (**Montagnier, 1998**).

Le VIH est un lentivirus appartenant à la famille des Retroviridae (**Nielsen *et al.*, 2005**). Les rétrovirus sont des virus à ARN enveloppés, caractérisés par la présence d'une transcriptase inverse ou reverse transcriptase (RT). Deux types de virus sont responsables de l'infection à VIH/sida : le VIH-1 qui est répandu dans le monde entier et le VIH-2 qui est essentiellement localisé en Afrique de l'ouest. Il existe des cas de co-infection à VIH-1 et VIH-2 limités à l'Afrique subsaharienne (**Fleury, 2002 ; 2009**).

Le VIH-1 est divisé en trois groupes. Il s'agit des groupes M, N et O. Le groupe M est majoritaire. Il est divisé en 9 sous-types, à savoir les groupes A, B, C, D, F, G, H, J et K (**Fleury, 2002**). Ces différents sous-types sont capables de se recombiner (**Yilmaz, 2007**).

Le VIH-2 comporte également plusieurs sous-types dont A à H. Seuls les sous-types A (Cap-Vert, Guinée-Bissau, Guinée, Sénégal) et les sous-types B (Côte d'Ivoire, Mali et Burkina Faso) ont une diffusion épidémique (**Vaubourdolle, 2007**).

La structure du VIH comprend :

Une enveloppe virale constituée d'une bicouche lipidique et de deux glycoprotéines dont la sous-unité de surface (protéine SU) gp120 joue le rôle de récepteur viral de la molécule membranaire CD4 des cellules hôte et la sous-unité transmembranaire (la protéine TM) gp 41 qui est responsable de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire de l'hôte. Ces deux glycoprotéines sont liées entre elles par des liaisons non covalentes (**Nielsen *et al.*, 2005**).

A l'intérieur, le core viral ou nucléocapside située à l'intérieur, inclut une couche de protéines de matrice p17 qui est une protéine myristilée renfermant la protéase virale et une couche plus profonde de protéines de capsid p24. La polymérisation de p24 conduit à la formation d'un cône tronqué renfermant le génome viral (**Fourati, 2012**) (**Figure 1**).

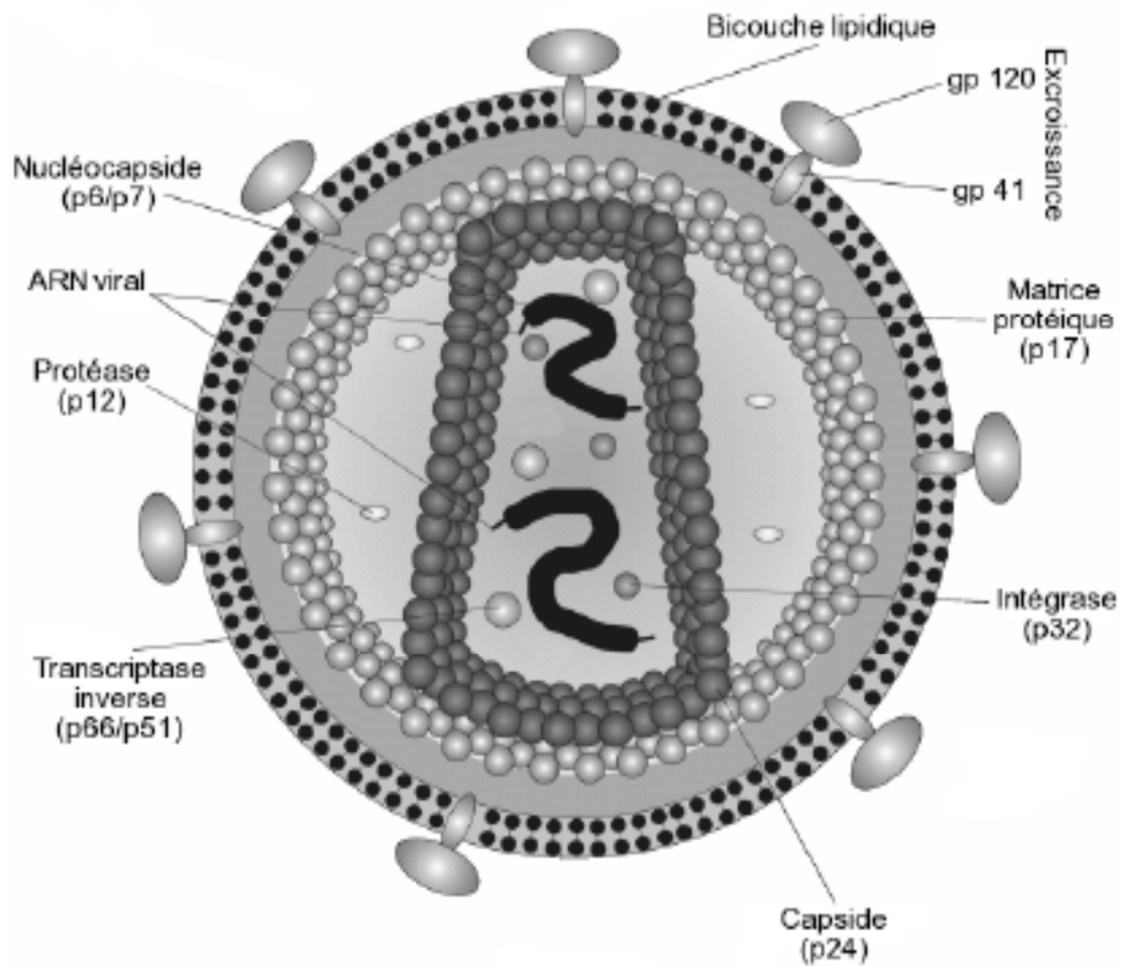


Figure 1: Structure du VIH (Kéita, 2014)

gp : Glycoprotéine

p : Protéine

Les nombres indiquent la masse de la molécule en kilo daltons

Le génome du VIH est constitué uniquement de deux molécules d'ARN monocaténares de 9,2 kb et de polarité positive ayant à chaque extrémité une région R identique, indispensable à la transcription inverse. Le génome du VIH se compose de trois gènes rétroviraux majeurs (env, gag, pol) qui possèdent trois enzymes virales c'est-à-dire la transcriptase inverse, la protéase et l'intégrase. Il comprend également six gènes rétroviraux mineurs dont les gènes régulateurs (tat, rev) et quatre (4) autres gènes, vif qui permet d'augmenter l'infectiosité, nef, vpu ou vpr et vpx pour le VIH-2 (**Figure 2**). Le gène tat favorise l'augmentation du niveau de synthèse des protéines virales quand rev favorise l'augmentation des ARN messagers correspondant aux protéines des trois gènes rétroviraux majeurs gag, pol et env. Toutes ces protéines ont un rôle important dans le cycle répliatif viral et dans l'infectiosité virale (**Yilmaz, 2007**).

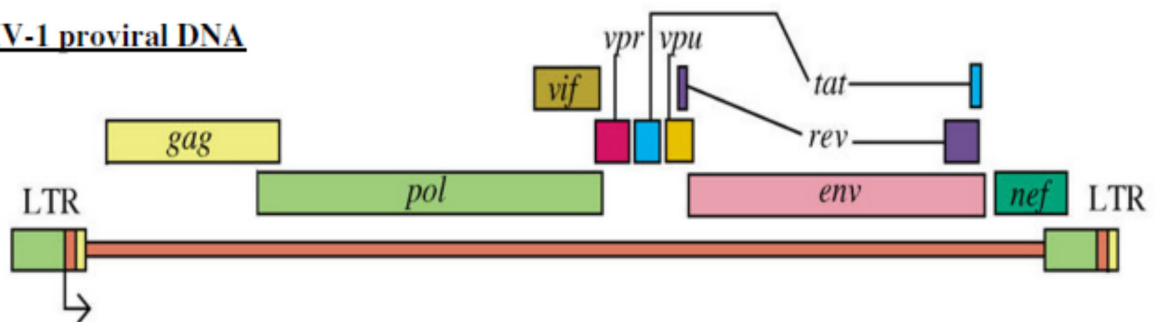
Le VIH infecte les cellules qui portent le cluster de différenciation quatre (CD4) à leur surface comme, les lymphocytes T helpers ou auxiliaires, les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules de Langerhans et les cellules microgliales du système nerveux (**Iordanskiy et al., 2015**). En effet, il se produit une interaction de haute affinité entre la protéine gp120 de l'enveloppe virale et le marqueur membranaire CD4 de la cellule cible. La liaison gp120/CD4 n'est toutefois pas suffisante pour assurer l'entrée du VIH dans la cellule. Cette pénétration nécessite l'expression de corécepteurs membranaires CXCR4 (fusine) et CCR5 présents respectivement sur les lymphocytes T CD4⁺ et sur les monocytes. De ce fait, il existe plusieurs souches de VIH dont les souches qui utilisent le corécepteur CCR5 pour infecter les monocytes et les macrophages qui sont des souches à tropisme M, et les souches qui utilisent le corécepteur CXCR4 pour infecter préférentiellement les lymphocytes T CD4⁺ qui sont des souches à tropisme lymphocytaire ou tropisme T (**Yilmaz, 2007**).

I.1.2. Cycle de répliation

Le VIH, pour se répliquer, doit insérer son matériel génétique à l'intérieur des lymphocytes T CD4⁺ et produire de nouveaux virus. Ce processus peut se résumer en 4 étapes distinctes et successives (**Figure 3**).

- La première étape correspond à la pénétration du virus dans la cellule hôte. Le virus se fixe sur la cellule cible par reconnaissance entre la protéine virale gp120 et son récepteur spécifique, la protéine CD4 du lymphocyte T ou d'autres cellules phagocytaires mononuclées. Cette liaison de très haute affinité entraîne un changement conformationnel de la gp120 qui permet à une région spécifique, la boucle V3 d'interagir avec des corécepteurs (CCR5 et CXCR4) également présents à la surface de la membrane cellulaire. L'interaction du cofacteur

HIV-1 proviral DNA



HIV-1 RNA species

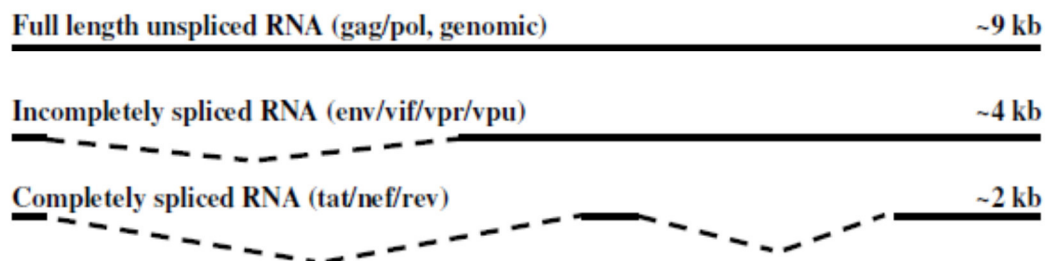


Figure 2 : Structure du génome du VIH (Nielsen *et al.*, 2005)

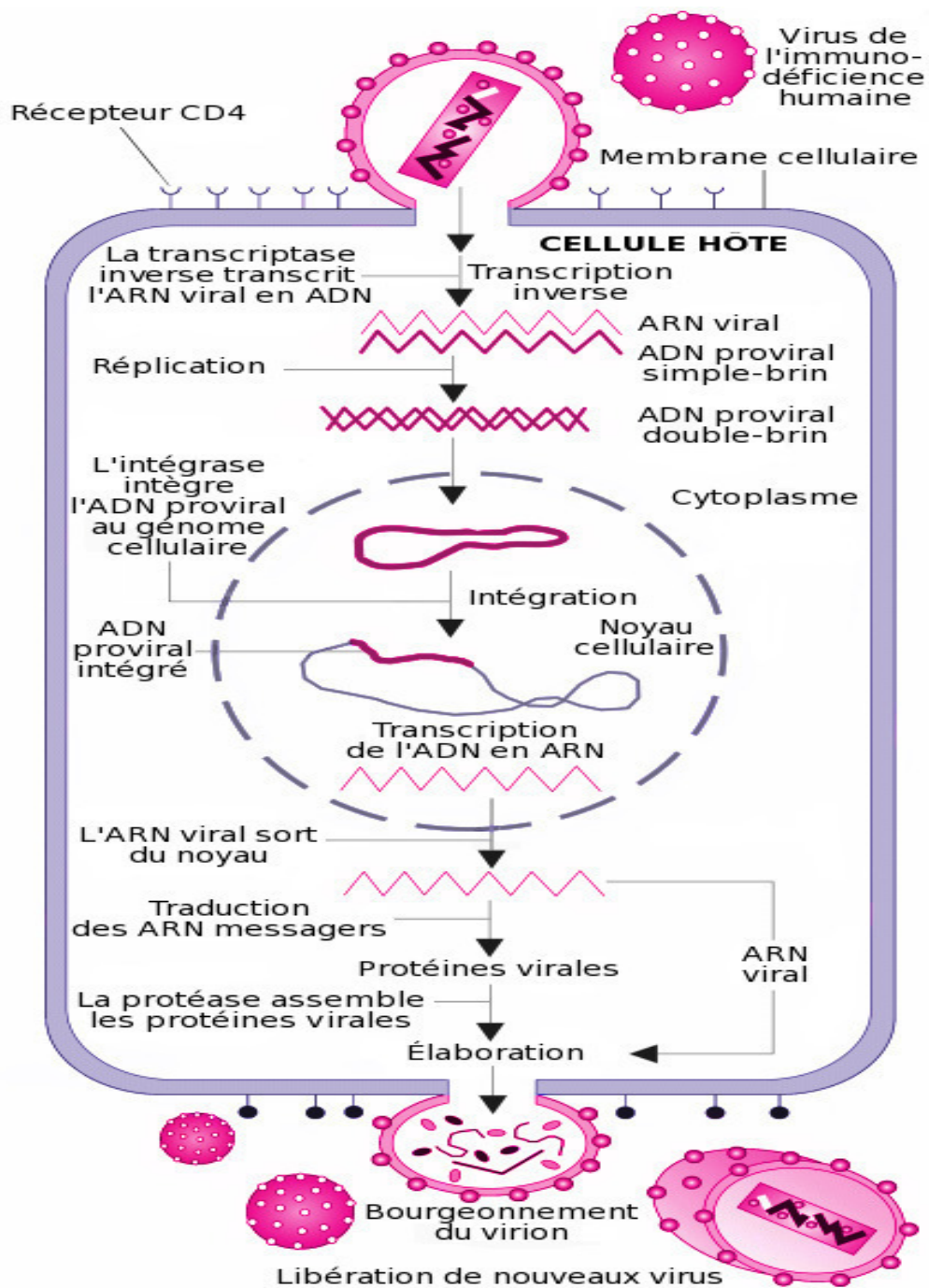


Figure 3 : Cycle de réplcation du VIH (Rothe *et al.*, 1996)

au complexe gp120/CD4 induit un changement conformationnel qui permet de démasquer la protéine virale gp41 entraînant ainsi la fusion des membranes (Yilmaz, 2007 ; Waki et Freed, 2010).

- La deuxième étape est la rétrotranscription de l'ARN viral en ADN proviral, grâce à la transcriptase inverse. Après fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique de la cellule cible, la nucléocapside pénètre dans le cytoplasme de la cellule cible et libère le génome viral et les enzymes. Débute, alors, la rétrotranscription du génome viral. La transcriptase inverse virale catalyse la transcription inverse de l'ARN, formant des hybrides ADN-ARN. La matrice d'ARN étant ensuite dégradée par une activité ribonucléase H (RNase H) de la transcriptase inverse, il y a synthèse d'un second brin d'ADN. Cette étape fortement régulée est sous le contrôle des protéines Vif et de la nucléocapside. La protéine Vif a pour rôle de contrôler l'accrochage de l'amorce spécifique, un t-RNALys, qui permettra par la suite de reconnaître le progénome viral et de l'adresser au noyau de la cellule. Cette étape est responsable d'erreurs fréquentes, un pour 10000 copies de virus. Elle est à l'origine de la variabilité génétique du VIH (Bousquet, 2008).

- Au cours de la troisième étape, l'ADN viral intègre le génome de la cellule hôte grâce à l'intégrase virale (Fourati, 2012).

- La quatrième étape est la production de nouvelles particules virales qui seront capables de bourgeonner et de devenir matures après leur libération dans le milieu extracellulaire. La réplication du virus est intense. En effet, environ 1 à 10 milliards de virions sont produits chaque jour par une personne infectée, non traitée (Rothe *et al.*, 1996).

I.1.3. Epidémiologie

Dans le monde, selon **ONUSIDA (2017)**, 36,7 millions de personnes vivent avec le VIH en 2016 contre 33,3 millions de personnes en 2015. En 2016, 1,8 millions de nouvelles personnes ont été infectées. Les décès liés au sida enregistrés sont au nombre d'un (1) million (**ONUSIDA, 2017**) contre 1,1 million en 2015 (**WHO, 2016**). L'Afrique est le continent le plus touché par l'infection à VIH/Sida avec 25,6 millions de personnes vivant avec le VIH (**WHO, 2017**). En 2012, 70 % des personnes vivant avec le VIH (PVVIH) résident en Afrique subsaharienne, avec 1,6 million de nouvelles infections à VIH. L'Afrique subsaharienne est également à l'origine de 72 % des nouvelles infections et de 70 % des décès. Le taux de prévalence du VIH chez les jeunes femmes demeure plus du double de celui des hommes en Afrique subsaharienne (**UNAIDS, 2013a**). En Côte d'Ivoire, la prévalence du VIH était de 3,4 % (**Anonyme 1, 2012**). Elle a donc connu une baisse depuis 2005, date à laquelle, elle était

estimée à 4,7 %. Selon l'ONUSIDA, en 2016, ce taux est passé à 2,7 %. En 2016, la population des séropositifs au VIH est de 460 000 (UNAIDS, 2016). La tranche de la population la plus touchée se situe entre 25 et 49 ans avec un pic parmi les 30 à 34 ans. Le taux de prévalence est plus élevé chez les femmes (6,4 %) que chez les hommes (2,9 %) quelle que soit la région (Anonyme 2, 2015).

I.1.4. Modes de transmission

Les modes de transmission du VIH sont bien connus. Il s'agit de la transmission sexuelle qui est le mode le plus fréquent, la transmission sanguine c'est-à-dire le sang et ses produits dérivés et la transmission de la mère à l'enfant lors de la grossesse, au moment de l'accouchement et lors de l'allaitement. La transmission du VIH dépend de deux facteurs que sont la charge virale du milieu contaminant et l'impact de la profondeur ou de l'intimité de la contamination (WHO/UNAIDS, 2011).

I.2. SYMPTOMATOLOGIE DE L'INFECTION A VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE

L'infection à VIH se déroule en trois phases distinctes au cours de l'évolution de la maladie (Annexe 1).

➤ *Primo-infection*

Elle intervient juste après la pénétration du VIH dans l'organisme. Le nombre de virus présents (charge virale) augmente fortement, puis diminue rapidement du fait de la réponse du système immunitaire. Cette première phase s'accompagne de symptômes qui ressemblent à ceux de la grippe et disparaissent après quelques semaines. La primo-infection ne se manifeste pas chez toutes les personnes infectées et passe parfois inaperçue bien qu'elle puisse s'étendre entre trois et huit semaines (Philippon, 2007).

➤ *Phase asymptomatique*

Elle vient après la période de primo-infection et les personnes atteintes par le VIH ne présentent aucun signe physique de maladie. Elle peut durer jusqu'à douze ans au cours desquelles, le nombre de virus n'augmente que très légèrement, mais le nombre de variants augmente fortement, notamment dans les réservoirs viraux. C'est la période durant laquelle les effets toxiques du virus semblent apparemment être contrôlés par l'organisme, notamment par le système immunitaire c'est-à-dire la réponse humorale et cellulaire. Les lymphocytes T sont progressivement détruits par le virus. Lorsque les personnes atteintes par le VIH ne présentent aucun signe physique de maladie, elles sont dites asymptomatiques (Hidreau, 2006).

➤ *Phase symptomatique*

Au cours de cette phase, il y a l'apparition de symptômes persistants comme la fatigue chronique, des sueurs nocturnes, de la fièvre, de la diarrhée ou une perte de poids importante dus à l'affaiblissement du système immunitaire. Le nombre de virus augmente fortement. Cette phase est suivie du sida qui se manifeste par l'apparition d'infections opportunistes telles que la pneumonie, la toxoplasmose, le sarcome de Kaposi, la tuberculose, les infections cutanéomuqueuses, la candidose œsophagienne, le cancer invasif du col de l'utérus, le cancer de l'anus, etc. Ces infections opportunistes sont causées par des bactéries, des virus ou des champignons. Elles sont liées à une immunodépression avancée, d'autant plus fréquentes que le taux de lymphocytes T CD4+ est inférieur à 200 cellules/mm³ (Mitsuyasu, 1999). De façon générale, cette évolution naturelle de l'infection par le VIH provoque la déplétion des lymphocytes T CD4+ et conduit à une immunodéficiência accompagnée d'un état d'inflammatoire avec un risque accru de complications. Une réponse immunitaire insuffisante contre le VIH permet la réplication virale, conduisant à une continuelle activation immunitaire (Lane, 2010).

I.3. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

I.3.1. Diagnostic sérologique

Le diagnostic indirect ou sérologique de l'infection repose sur la détection des anticorps sériques qui reste dans la majorité des cas la démarche diagnostique la plus pertinente et la plus accessible (Huraux *et al.*, 2003 ; Philippon, 2007). Il fait intervenir différents tests rapides.

- Test rapide Determine et Stat-pak dont le principe est une réaction immunochromatographique
- Test rapide discriminant Génie III ou Bioline dont le principe est immunoenzymatique (Hønge *et al.*, 2014 ; 2015 ; Gautheret-Dejean *et al.*, 2015).

Ces tests de dépistage sont des tests qualitatifs rapides pour la recherche d'anticorps anti-VIH-1 et 2 (Chaillet *et al.*, 2010). Validés par l'OMS, ils sont particulièrement utilisés dans les pays en voie de développement (Hidreau, 2006 ; Hønge *et al.*, 2014 ; 2015).

- Test rapide confirmation ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

Ce test est une méthode immunoenzymatique combinée à la détection de l'antigène Ag p24 dont le principe est basé sur la révélation de la présence d'anticorps dirigés contre

différentes protéines du VIH. Le test ELISA utilise différents types d'antigènes, correspondant au VIH 1 et au VIH 2 (**Huraux et al., 2003**). La positivité du test de confirmation pour le VIH1 se confirme lorsqu'existe une réactivité vis-à-vis d'au moins deux glycoprotéines d'enveloppe c'est-à-dire gp41, gp120, gp160 (**Huraux et al., 2003 ; Philippon 2007**).

I.3.2. Détermination de la charge virale

Le diagnostic direct repose sur les tests de biologie moléculaire, la recherche d'antigène P24 et les tests de résistance aux antirétroviraux.–Son principe est basé sur l'amplification génomique par PCR, avec un seuil de détection actuel de 20 à 50 copies/mL. Il donne une positivité plus précoce que les sérologies habituelles. Sa limite est le laps de temps entre la contamination et la détection du virus dans le sang (8-10 jours) (**Huraux, 2003 ; Philippon 2007**).

I.3.3. Comptage des lymphocytes T CD4+

Ce comptage se fait par la technique de Cytométrie en Flux. Le principe est basé sur l'analyse rapide des particules (cellules) en mouvement qui défilent une à une à l'intérieur d'une gaine liquide, devant un faisceau lumineux à rayon laser (**Ormerod et Imrie, 1990**).

I.4. TRAITEMENT CURATIF ET PREVENTION

I.4.1. Traitement curatif antirétroviral

Les objectifs du traitement sont de baisser la mortalité et la morbidité dues à l'infection à VIH par la restauration du taux normal des lymphocytes T CD4+ et la qualité de la réponse des lymphocytes T CD4+ pour la réduction de la réplication virale (**Chaix et Goujard, 2009**).

L'Organisation Mondiale de la santé recommande désormais un traitement antirétroviral universel (ART) quel que soit le nombre de CD4+ (**WHO, 2016**). La priorité est donnée aux personnes présentant une infection à VIH sévère ou à un stade avancé et à celles dont le nombre de lymphocytes T CD4+ est inférieur ou égal à 500 cellules/mm³. Le traitement doit être immédiat quelle que soit la numération des lymphocytes T CD4+ pour les femmes enceintes vivant avec le VIH, les séropositifs atteints de tuberculose ayant entamés le traitement antituberculeux et les enfants âgés d'un à dix ans (**WHO, 2016**).

La stratégie des traitements antirétroviraux est d'inhiber de façon ciblée les différentes étapes du cycle de réplication du VIH afin de prévenir l'infection de nouvelles cellules et la production de virions (**OMS, 2013**) (**Figure 4**). Il est donc recommandé qu'une trithérapie soit faite par l'association de deux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) plus

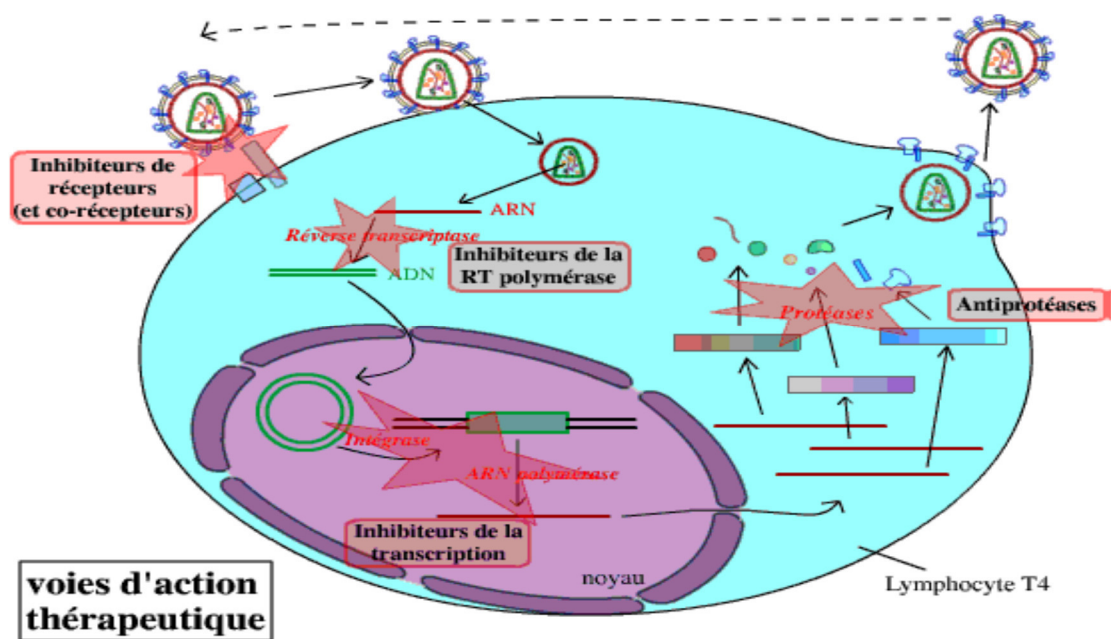


Figure 4 : Cibles des antirétroviraux (Hidreau, 2006)

un inhibiteur de la protéase (IP) ou de deux INTI plus un inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse (INNTI) ou 3 INTI (WHO, 2016).

➤ *Différentes classes d'antirétroviraux et leurs cibles*

Le traitement antirétroviral relève actuellement de six classes médicamenteuses (Annexe 2) : les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI), les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI), les inhibiteurs de la protéase (IP), les inhibiteurs de fusion, les inhibiteurs d'entrée, les inhibiteurs d'interaction et les inhibiteurs d'intégrase (Bousquet, 2008).

➤ *Association antirétrovirale recommandée*

Elle est composée d'au moins trois médicaments. Une trithérapie comprend pour les traitements de première intention ou première ligne une combinaison de 2 INTI et 1 INNTI et pour ceux de la deuxième ligne, une association de 2 INTI dont un au moins est nouveau et 1 IP potentialisé par le ritonavir.

L'option privilégiée recommandée en première intention pour la mise en route du traitement est la combinaison TDF + 3TC (ou FTC) + EFV. En cas de contre-indication, il est recommandé d'utiliser l'une des options suivantes, soit AZT + 3TC + EFV, AZT + 3TC + NVP et TDF + 3TC (ou FTC) + NVP.

La combinaison antirétrovirale de deuxième intention utilisée chez l'adulte après échec thérapeutique de première intention doit être composée de 2 INTI [AZT + 3TC ou TDF + 3TC (ou FTC)] + 1 IP potentialisé par le Ritonavir (r). Les associations d'ARV en doses fixes thermostables ATV/r et LPV/r (Lopinavir boosté au Ritonavir) sont les options privilégiées d'IP potentialisés pour le traitement antirétroviral de deuxième intention (WHO, 2013). En Côte d'Ivoire, depuis 2015, le régime thérapeutique de première ligne préférentiel est TDF + 3TC + EFV en combinaison fixe c'est-à-dire 1 comprimé/jour.

En cas d'insuffisance rénale, de diabète non contrôlé, d'hypertension artérielle non contrôlée le schéma utilisé sera : AZT ou ABC + 3TC + EFV. En cas d'intolérance à l'Efavirenz, cette molécule est remplacée par la Névirapine. Et la combinaison recommandée est : TDF + 3TC + NVP. Si des effets indésirables hépatiques graves sont observés, l'Efavirenz est remplacé par LPV/r. Le schéma proposé en deuxième ligne associe AZT + 3TC + ATV/r ou LPV/r et TDF + 3TC + LPV/r. De plus, si la combinaison TDF + 3TC a été utilisée en première ligne, la combinaison d'INTI recommandée en seconde ligne est AZT + 3TC et vice versa (Anonyme 2, 2015).

I.4.2. Prévention

L'enrayement de la pandémie du VIH passe par la prévention. Le seul moyen d'éviter la transmission sexuelle du VIH est l'utilisation de préservatifs et l'abstinence. En plus, une incitation aux modifications de comportement par des campagnes d'informations collectives et la multiplication des sources d'information individuelle (internet, plannings familiaux, associations, etc.) sont aussi des solutions.

Pour la transmission mère-enfant, un traitement antirétroviral efficace chez la mère permet une réduction considérable du risque de transmission en cas d'indéfectibilité de la charge virale lors du dernier trimestre de grossesse. De même, un traitement prophylactique systématique de l'enfant pendant les 4 à 6 premières semaines de vie et la proscription de l'allaitement lorsque cela est possible, sont des moyens de réduction du risque de transmission du VIH (OMS, 2013).

II. SANG

II.1. DEFINITION ET CONSTITUANTS DU SANG

Le sang est un liquide épais et visqueux constitué principalement du plasma qui est la partie liquide et de cellules (globules rouges, globules blancs, plaquettes) qui lui donnent son aspect épais et visqueux (Don *et al.*, 2002).

Sa principale mission est de transporter de l'oxygène dans les différentes parties de l'organisme, en diffusant à l'intérieur des vaisseaux. Il représente 1/13^{ème} du poids total du corps humain. Un homme adulte en contient environ 5 litres. Il se compose à 45 % de cellules et à 55 % de plasma.

II.1.1. Cellules du sang

➤ ***Globules rouges ou hématies***

Les globules rouges portent aussi le nom d'hématies ou d'érythrocytes. Ce sont des cellules anucléées (chez les humains) ayant la forme d'un disque et de couleur rouge.

➤ ***Globules blancs ou leucocytes***

Les globules blancs portent aussi le nom de leucocytes. Ce sont des cellules incolores et nucléées. Les macrophages et les lymphocytes B et T sont des globules blancs très importants.

➤ ***Plaquettes sanguines***

Les plaquettes sanguines encore appelées thrombocytes sont des fragments de cellules formées dans la moelle osseuse. Elles ne possèdent pas de noyau et leur durée de vie est d'environ 8 à 10 jours.

II.1.2. Plasma

Le plasma est constitué principalement d'eau à 91,5 %, de 7 % de protéines comme l'albumine, les globulines, le fibrinogène et les 1,5 % restants sont des nutriments, des hormones, du gaz dissous et des électrolytes. Le plasma contient des substances qui sont très importantes pour le maintien du bien-être de l'organisme et permet le transport du dioxyde de carbone (CO₂) qui s'y dissout. Il permet aux cellules du sang de circuler dans le système vasculaire. Dans le plasma, les nutriments sont constitués d'acides aminés, d'acides gras, de glycérol, de monosaccharides, d'éléments minéraux, de vitamines, etc. Ces nutriments, en transit dans le plasma, vont servir à la satisfaction des différents besoins de synthèse et de production d'énergie des cellules.

II.2. CELLULES MONONUCLEÉES DU SANG PÉRIPHÉRIQUE

II.2.1. Définition

Les cellules mononucléées du sang périphérique (CMSP) ou peripheral blood mononuclear cells (PBMC) sont les cellules du sang périphérique ayant un seul noyau. Ces cellules sont composées de monocytes, de macrophages et de lymphocytes (cellules T, cellules B, cellules NK) (**Pedersen *et al.*, 2011**). Elles font partie du système immunitaire humain (**Bergereau, 2010**) (**Annexe 3**).

II.2.2. Classification, rôles et fonctions

➤ *Monocytes*

Les monocytes sont des cellules mononucléées qui expriment la molécule CD4 et participent à la défense immunitaire de l'organisme humain. Ils ont une durée de vie très courte dans le milieu sanguin (environ 24 heures). Ils passent ensuite dans les tissus où ils se différencient en macrophages. Les monocytes sont chargées de la capture et de la dégradation de l'antigène, puis de sa présentation aux lymphocytes T (**Randolph *et al.*, 2008**). Ils apparaissent arrondis avec un diamètre de 15 à 20 µm en microscopie optique. Leur cytoplasme est gris bleuté (ciel d'orage) avec un aspect un peu granuleux au May Grunwald Giemsa (**Kramer *et al.*, 2014**). Les monocytes appartiennent au système des phagocytes mononucléés (**Iordanskiy *et al.*, 2015**) (**Annexe 4**).

➤ *Lymphocytes*

Les lymphocytes (**Annexe 4**) sont des cellules mononucléées qui participent à la réponse immunitaire. Leur durée de vie est variable. En microscopie optique, ce sont des cellules de

forme régulièrement arrondie, de petites tailles d'environ 7 µm de diamètre avec un noyau sphérique et dense occupant la quasi-totalité de la cellule. Il existe une petite frange cytoplasmique périphérique d'aspect mauve au May Grunwald Giemsa (MGG) (**Kramer et al., 2014 ; Menck et al., 2014**). Il existe deux populations de lymphocytes mises en évidence par des marqueurs antigéniques de membrane. Les lymphocytes T qui ont acquis leur spécificité dans le thymus et les lymphocytes B qui arrivent à maturité dans la bourse de Fabricius.

Dans le sang circulant, la majorité des lymphocytes sont de type T (70 à 80 %) et de type B. Il existe deux sous-populations de lymphocytes T du sang périphérique dont la sous-population des lymphocytes T CD4+ qui représentent 60 à 80 % de lymphocytes T et sécrètent des lymphokines, puis celle représentant les lymphocytes T CD8+ qui sont cytotoxiques. La réplication virale concerne majoritairement les lymphocytes T CD4+ dans l'infection à VIH (**Levy, 2007**). Par contre, les lymphocytes B dérivent de cellules pré-B caractérisées par la présence de chaînes lourdes intra-cytoplasmiques qui précèdent l'apparition des immunoglobulines de surface. Ils sont responsables de l'immunité humorale et fabriquent les immunoglobulines appelées anticorps. Il existe une population de cellules dénommées 'naturel killer' (NK) qui n'appartiennent ni à la sous-population B ni à la sous-population T (**Viallard et al., 2006**).

III. MICRONUTRIMENTS

Les besoins nutritionnels d'un individu sont les quantités de nutriments (macronutriments et de micronutriments). Ils sont indispensables au maintien d'un bon état de nutrition et de santé.

Les micronutriments sont composés de vitamines et d'éléments minéraux (**Dorosz, 2004**). Ce sont des nutriments sans valeur énergétique qui ne peuvent pas être fabriqués par l'organisme. Ils doivent impérativement être apportés par une alimentation variée, équilibrée et de bonne qualité. Ils sont nécessaires en faibles quantités, mais indispensables à l'organisme (**Welch et Graham, 2004 ; Semba et al., 2006**).

III.1. MINÉRAUX

Les éléments minéraux sont répartis en macroéléments (calcium, phosphore, chlore, magnésium, potassium, sodium, soufre) et en oligo-éléments (cuivre, fluor, iode, manganèse, molybdène, sélénium, zinc, chrome) (**Dorosz, 2004**). Les minéraux représentent 4 % de la masse totale d'un individu et sont indispensables au bon fonctionnement de l'organisme. Constituants des enzymes, des hormones et des vitamines, les minéraux contribuent à la structure des os et des dents et sont associés au rythme cardiaque, à la contraction musculaire,

à la conduction nerveuse et à l'équilibre hydrique et acido-basique de l'organisme. Cependant, ils partagent tous les caractéristiques d'intervenir à faible concentration et d'entraîner de graves conséquences sur la santé en cas de déficience ou de carence.

III.2. VITAMINES

Les vitamines sont des substances organiques nécessaires en faible quantité au métabolisme d'un organisme vivant qui n'est pas capable de synthétiser, ou de synthétiser en quantité suffisante. Par conséquent, elles doivent être fournies régulièrement par l'alimentation **(Huang *et al.*, 2007)**. Les vitamines sont habituellement classées en deux grands groupes :

- Les vitamines hydrosolubles, c'est-à-dire les vitamines des groupes B et C qui sont excrétées dans une large mesure dans l'urine. L'organisme n'en retient que très peu pour les utiliser immédiatement. Elles sont présentes dans les aliments réputés peu gras **(Huang *et al.*, 2007)**.
- Les vitamines liposolubles, c'est-à-dire les vitamines A, D, E et K, qui peuvent être stockées dans l'organisme. Elles ne sont normalement pas excrétées dans l'urine, contrairement aux vitamines hydrosolubles. Elles sont présentes dans les aliments réputés gras **(Monsigny *et al.*, 2004 ; Huang *et al.*, 2007 ; Muller et Kappes, 2007)**. Parmi les vitamines liposolubles, les vitamines A et D jouent un rôle essentiel dans la modulation de l'efficacité des défenses immunitaires grâce à leurs propriétés immunostimulantes. La vitamine E, quant à elle, possède d'excellentes propriétés antioxydantes et immunostimulantes. La vitamine K joue un rôle sur le processus de coagulation du sang **(Wintergerst *et al.*, 2007)**.

III.2.1. Vitamine D

A la différence des autres vitamines liposolubles qui ont une source alimentaire, la principale source de vitamine D est le soleil **(Armas *et al.*, 2004 ; Holick, 2004)**. La vitamine D, également appelée calciférol, est une vitamine liposoluble qui doit être considérée comme une pro-hormone de par sa similarité avec les hormones stéroïdes **(Bikle, 2009)**. Elle ne répond pas à la définition classique d'une vitamine. Il existe deux formes de vitamine D dont le cholécalciférol ou vitamine D₃ d'origine animale et l'ergocalciférol ou vitamine D₂ qui est d'origine végétale (céréales, champignons et levures) **(Annexe 5) (Deluca, 2014 ; Landrier, 2014)**. En effet, dans la plante, la provitamine D₂ ou ergostérol, qui est un dérivé du cholestérol est transformé en ergocalciférol sous l'action des rayons ultraviolet B (UVB) **(Deluca, 2014)**.

La vitamine D₃, appelée cholécalciférol, est la forme de vitamine D synthétisée par l'homme au niveau cutané sous l'effet des UVB (**Muller et Kappes, 2007**). Elle a été découverte en 1782 par Dr Darbey, un médecin anglais. C'est plus tard en 1932 que fut isolée la vitamine D₂ par Dr Adolf Windaus et ses collaborateurs (**Deluca, 2014**).

III.2.1.1. Métabolisme de la vitamine D₃

La vitamine D₃ est une pro-hormone dérivée principalement du cholestérol qui a deux origines dont une endogène et l'autre exogène (**Figure 5**).

- L'origine endogène est la synthèse faite dans l'épiderme à partir du 7-déhydrocholestérol ou provitamine D₃, issu du cholestérol, et présent dans les membranes des cellules du derme et de l'épiderme. Sous l'effet de rayonnements UVB, il est transformé en pré-vitamine D₃ et rapidement convertie en vitamine D₃ sous l'effet de la chaleur (**Carlberg et al., 2013**).

- L'origine exogène provient naturellement des aliments tels que les poissons (saumon, sardine, hareng, anchois, maquereau), les huiles de poisson, les œufs et l'huile de foie de morue (**Chen et al., 2007**). L'apport exogène est assuré par l'alimentation, apportant soit la vitamine D₂ ou ergocalciférol d'origine végétale, ou la vitamine D₃ (cholécalciférol) d'origine animale (**Nair et Maseeh, 2012**).

Toutes ces formes de vitamine D (vitamine D₂ et vitamine D₃) sont absorbées dans l'intestin grêle grâce à des sels biliaires, les chylomicrons, expliquant son caractère liposoluble (**Nair et Maseeh, 2012**). La vitamine D d'origine cutanée et alimentaire, une fois synthétisée ou ingérée, est transportée dans le sang par une protéine spécifique appelée vitamine D binding protéine (VDBP) pour être hydroxylée en 25 (OH) D₃ au niveau du foie (**Conesa-Botella et al., 2009**). Cette première hydroxylation hépatique est essentiellement réalisée par le CYP27A1 qui est la première enzyme identifiée pouvant la réaliser (**Tissandié et al., 2006**). Cette hydroxylation est effectuée par quatre enzymes du cytochrome P450, trois enzymes microsomaux (CYP2R1, CYP2J2 et CYP3A4), et une enzyme mitochondriale CYP27A1 qui intervient dans la biosynthèse des acides biliaires (**Tissandié et al., 2006 ; Pawlowska et al., 2016**). La 25 (OH) D₃ est ensuite métabolisée en sa forme active, la 1,25-dihydroxyvitamine D₃ (1,25 (OH)₂ D₃) par la 1- α -hydroxylase ou CYP27B1. Cette deuxième hydroxylation se produit principalement dans les reins, mais aussi dans les tissus extra-rénaux et les cellules immunitaires. La concentration circulante de la 1,25 (OH)₂ D₃ dépend de son catabolisme.

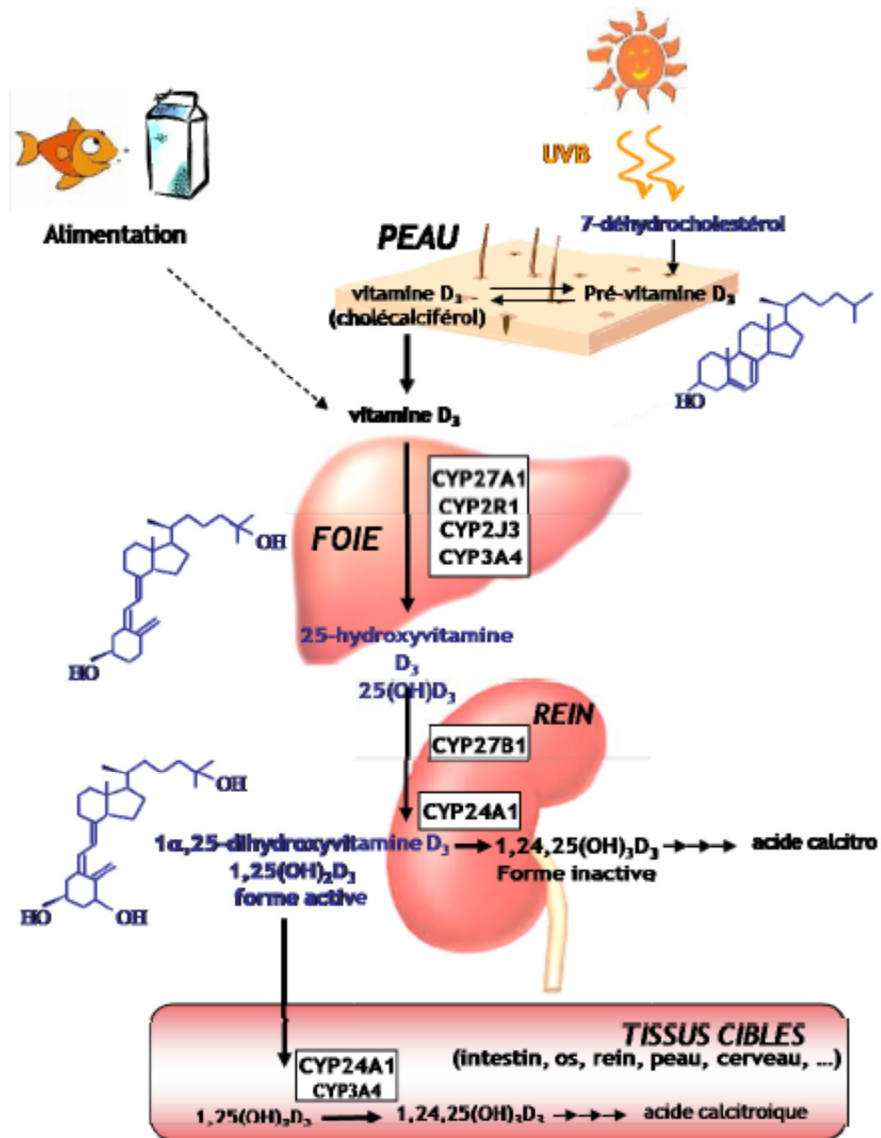


Figure 5 : Métabolisme de la vitamine D (Tissandié *et al.*, 2006)

En effet, le CYP24A1 catalyse la conversion de la 1,25 (OH)₂ D₃ en 1,24,25-trihydroxyvitamine D₃ (1,24,25 (OH)₃ D₃) et de la 25 (OH) D₃ en 24,25-dihydroxyvitamine D₃ (24,25 (OH)₂ D₃). C'est la première étape dans la voie de dégradation de la vitamine D₃ pour aboutir à une forme inactive, l'acide calcitroïque. Contrairement au CYP27A1 et CYP27B1, localisées respectivement dans le foie et le rein principalement, le CYP24A1 est ubiquitaire, contrôlant ainsi le taux de vitamine D₃ active à l'échelle de l'organisme (**Tissandié *et al.*, 2006**). La vitamine D₃ est stockée sous deux formes : environ 65 % en calciférol et 35 % en calcidiol. La vitamine D₃ non hydroxylée est contenue principalement dans le tissu adipeux, mais un tiers de sa quantité est retrouvé dans d'autres tissus. La 25 (OH) D₃, en revanche, est fortement présente dans le sérum, liée à la DBP avec une demi-vie de 45 jours (**Guilland, 2015**). Elle est la principale forme circulante de vitamine D₃ (**Bikle, 2011**). Ses concentrations sériques peuvent varier considérablement d'une personne à l'autre (**Carlberg *et al.*, 2013**). Les concentrations inférieures à 30 ng/mL (75 nmol/L) sont généralement considérées comme insuffisantes, tandis que les concentrations inférieures à 20 ng/mL (50 nmol/L) représentent une carence (**Deluca et Cantorna, 2001**).

III.2.1.2. Régulation du métabolisme de la vitamine D₃

La régulation du métabolisme de la vitamine D₃ dépend essentiellement des enzymes impliquées dans sa synthèse (CYP27A1 et B1) et dans son catabolisme (CYP24A1) (**Tissandié *et al.*, 2006**).

➤ Régulation de la synthèse de la vitamine D₃

La concentration circulante de la vitamine D₃ (25 (OH) D₃) est peu régulée. En effet, plus la quantité de vitamine D₃ synthétisée ou ingérée est grande, plus la production de 25 (OH) D₃ est importante. Néanmoins, dans le foie, le CYP27A1 impliqué dans la synthèse de 25 (OH) D₃, est modulé à l'étape transcriptionnelle par des récepteurs nucléaires (**Post *et al.*, 2001 ; Eloranta et Kullak-Ublick, 2005**) comme PPAR α et γ ayant des acides gras polyinsaturés comme ligands, HNF4 α (activé par des phosphorylations) et SHP ayant une activité de répression transcriptionnelle (**Tissandié *et al.*, 2006**). En revanche, dans le rein, l'activité du CYP27B1, responsable de la production de la forme active (1,25 (OH)₂ D₃), est étroitement régulée en augmentant l'activité du promoteur de la CYP27B1. La PTH libérée par les glandes parathyroïdes lors d'une hypocalcémie exerce un contrôle positif. La PTH intervient en augmentant l'activité du promoteur de la CYP27B1 via la phosphorylation du facteur de transcription CREB (cAMP-dependent response element binding protein) (**Armbrecht *et al.*,**

2003). À l'inverse, une hypercalcémie, une hypophosphatémie et/ou une augmentation de la concentration plasmatique en $1,25 \text{ (OH)}_2 \text{ D}_3$ inhibent la libération de PTH. De plus, le phosphore, le calcium et la $1,25 \text{ (OH)}_2 \text{ D}_3$ peuvent également agir directement sur l'enzyme (1- α -hydroxylase du CYP27B1) et donc sur le taux circulant de l'hormone active (**Brown et al., 1999**). De nombreux autres facteurs comme l'IGF-I (Insulin-like growth factor I), l'insuline, la calcitonine, le FGF 23 (fibroblastic growth factor 23) interviennent également dans la régulation de la CYP27B1 (**Tissandré et al., 2006**).

➤ Régulation du catabolisme de la vitamine D₃

La dégradation de la vitamine D₃ dans les reins dépend de la régulation de la CYP24A1. Les apports en phosphore et la PTH modulent l'activité et l'expression de cette enzyme de manière opposée à leur effet sur CYP27B1. De plus, une étude propose une régulation par la calcitonine de l'expression du gène codant CYP24A1 via la voie de signalisation Ras-PKC zêta (protéine kinase C d'isoforme zêta) (**Gao et al., 2004**). La $1,25 \text{ (OH)}_2 \text{ D}_3$ stimule la transcription de CYP24A1 (**Chen et DeLuca, 1995**) (**Figure 6**).

III.2.1.3. Vitamine D₃ et ses fonctions biologiques

➤ **Vitamine D₃ et homéostasie phosphocalcique**

Le principal rôle de la vitamine D₃ est la régulation de l'homéostasie du calcium et du phosphate (**Holick, 2007 ; Schuch et al., 2013**). La $1,25 \text{ (OH)}_2 \text{ D}_3$ assure ces effets dits « classiques » en intervenant au niveau de l'intestin, des reins et des glandes parathyroïdes, ainsi qu'en agissant directement sur l'os (**Dusso et al., 2005 ; Holick, 2007**).

- *Action de la vitamine D₃ dans l'intestin*

Elle permet une absorption intestinale accrue du calcium alimentaire et secondairement celle des phosphates. Elle assure cette fonction par le biais des récepteurs de la vitamine D (VDR) présents au niveau de l'intestin qui permettent à la $1,25 \text{ (OH)}_2 \text{ D}_3$ d'augmenter l'absorption de calcium. En effet, 10 à 15 % du calcium consommé est absorbé au niveau du duodénum et de la portion proximale du jéjunum par un phénomène passif. Lorsque la vitamine D₃ se fixe à son récepteur, cette absorption augmente de 30 à 40 %. Il en est de même pour l'absorption des phosphates inorganiques qui passe de 60 à 80 % en présence de calcitriol (**Holick, 2007**). En effet, la $1,25 \text{ (OH)}_2 \text{ D}_3$ augmente l'absorption des phosphates en augmentant la fluidité des membranes entre entérocytes et plasma, ainsi qu'en stimulant l'expression de co-transporteur Sodium-Phosphate (**Dusso et al., 2005**) (**Figure 7**).

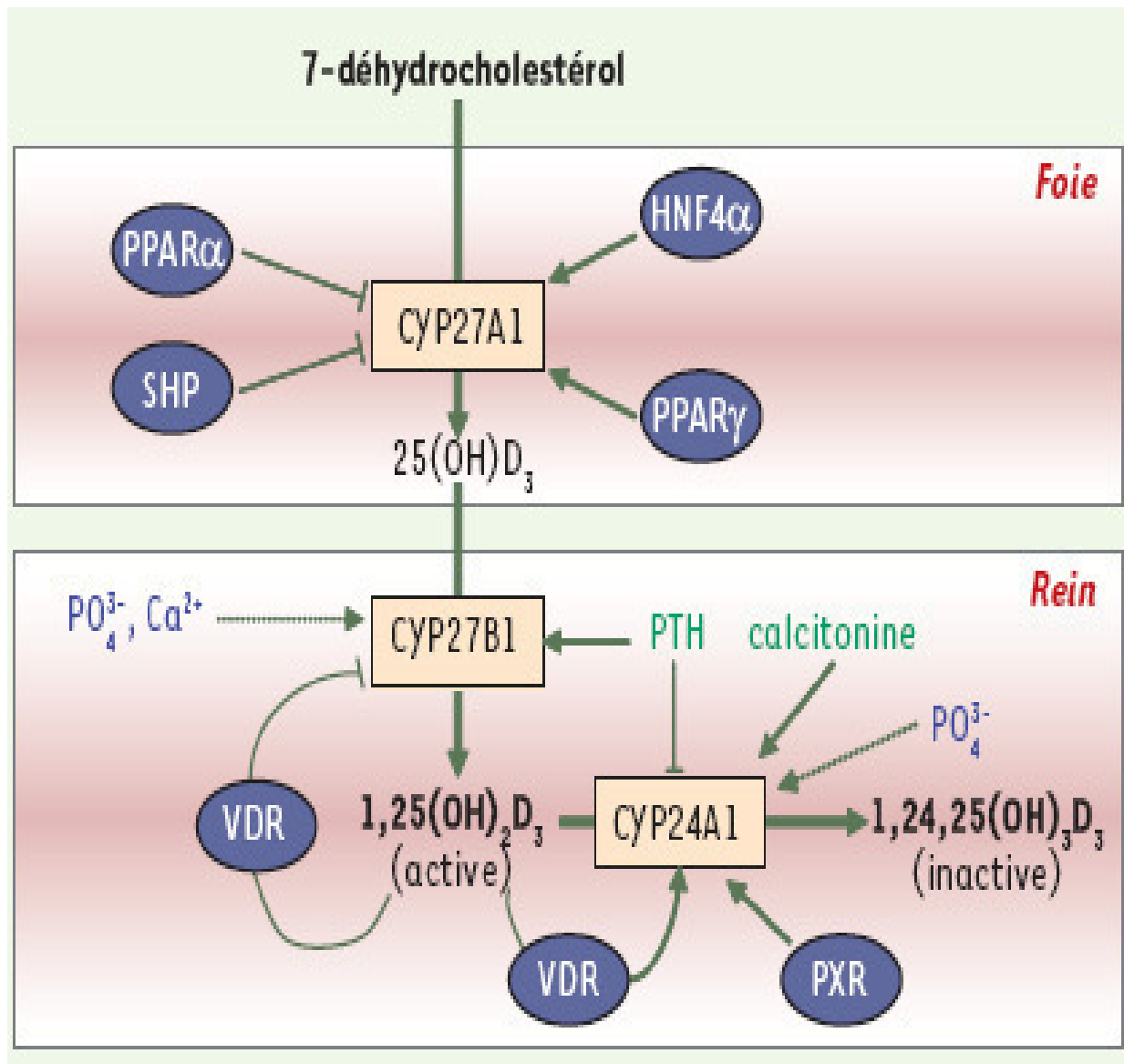


Figure 6 : Régulation du métabolisme de la vitamine D₃ par les hormones (Tissandié *et al.*, 2006)

- Flèche droite, stimulation
- Flèche brisée, inhibition
- Flèche en pointillée : faible action de régulation.

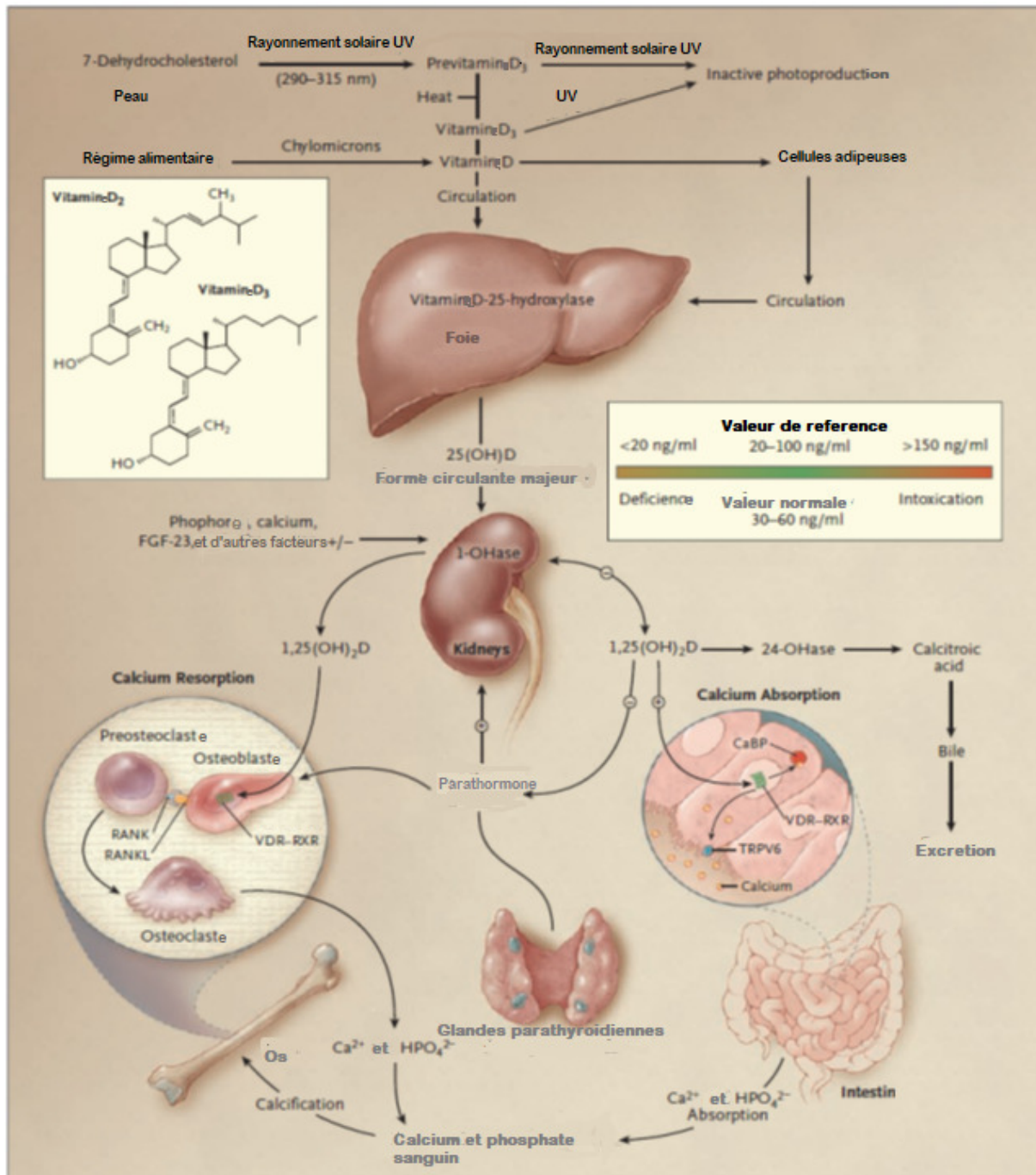


Figure 7 : Vitamine D et régulation de l'homéostasie phosphocalcique (Holick, 2007)

- *Action de la vitamine D₃ au niveau du rein*

Dans le rein, la vitamine D₃ a pour activité principale le contrôle de son homéostasie. La production rénale de calcitriol y est finement régulée par le biais de la 1- α -hydroxylase et de la 24-hydroxylase présentes dans les cellules rénales. La production de la vitamine D₃ est régulée par le besoin de calcium et de phosphore. Des niveaux légèrement bas de calcium plasmatique stimulent les parathyroïdes pour produire et sécréter l'hormone parathyroïdienne. Cette hormone se lie à toute la longueur du néphron du rein. Elle stimule la 1- α -hydroxylase qui produit l'hormone active (calcitriol) de la vitamine D₃ (**Deluca et Cantorna, 2001**).

Outre sa régulation, le calcitriol joue également dans le rein un rôle direct sur la réabsorption du calcium par une action directe sur le canal épithélial calcique (ECaC). En effet, comme dans les cellules de l'intestin, la 1,25 (OH)₂ D₃ stimule dans les cellules du tubule contourné distal le TRPV5 permettant la réabsorption de calcium par la cellule rénale, ainsi que l'expression des calbindines facilitant son transport intracellulaire. D'autres actions effectuées au niveau rénal sur la réabsorption de calcium, des ions phosphates et l'excrétion rénale du calcium, ne sont pas dues directement au calcitriol, mais sont initialement induites par la PTH (**Tissandé et al., 2006**) (**Figure 7**).

- *Action de la vitamine D₃ au niveau des glandes parathyroïdes*

Les glandes parathyroïdes détectent les variations de calcémie parce qu'elles expriment des Récepteurs Sensibles au Calcium (RSCa). Lorsqu'une diminution de calcium circulant se fait ressentir, la synthèse de PTH par ces glandes est augmentée. Le calcitriol inhibe la synthèse de PTH ainsi que la croissance des cellules parathyroïdes, par effet suppresseur. Il régule également le nombre de VDR présent dans les cellules parathyroïdes. De plus, le couple 1,25 (OH)₂ D₃-VDR induit la transcription du gène codant les RSCa et module donc la réponse des glandes parathyroïdes au calcium (**Dusso et al., 2005**) (**Figure 7**).

- *Action de la vitamine D₃ sur l'os*

La vitamine D₃ a aussi une action directe sur les cellules osseuses. En effet, la présence du CYP27B1 dans les ostéoblastes permet l'hydroxylation extra-rénale de la 25 (OH) D₃ circulante en 1,25 (OH)₂ D₃. Au niveau des ostéoblastes d'une part, la 1,25 (OH)₂ D₃ régule la transcription du gène codant la chaîne α 1 du collagène de type I, et induit la production de phosphatase alcaline, d'ostéopontine et d'ostéocalcine, participant ainsi, à la formation et à la minéralisation de la matrice extracellulaire osseuse. D'autre part, elle agit sur les cellules en charge de la résorption osseuse. Elle assure avec les ostéoblastes, l'initiation et le contrôle des

ostéocytes, ainsi que le remodelage permanent du tissu (les ostéoclastes) **(De Verneuil et Marie, 1993) (Figure 7)**.

➤ Bilan phosphocalcique

Le bilan phosphocalcique est un paramètre important dans l'homéostasie de l'organisme humain. Il apprécie l'équilibre phosphocalcique de l'organisme. En cas de perturbation de cet équilibre, sous la forme d'un excès ou d'une insuffisance de calcium dans le sang (hypercalcémie ou hypocalcémie) et/ou d'un excès ou d'une insuffisance de phosphore dans le sang (hyperphosphatémie ou hypophosphatémie), le bilan phosphocalcique essaie d'en quantifier l'importance et d'en retrouver l'origine **(Milovanova et al., 2012)**.

Le métabolisme phosphocalcique fait intervenir le calcium, le phosphore, la 25-hydroxyvitamine D₃, et l'hormone parathyroïdienne (PTH). Lorsque ce bilan est affecté, il cause une hypocalcémie ou une hypercalcémie et une hypophosphatémie ou une hyperphosphatémie, une hyperparathyroïdie ou hypoparathyroïdie et une déficience en 1,25 (OH)₂ D₃ **(Milovanova et al., 2012)**. Ces troubles minéraux ont un effet délétère sur l'os et induisent un processus de calcification cardiovasculaire accéléré et une insuffisance rénale aiguë **(Bover et Cozzolino, 2011)**.

- Métabolisme du calcium

Le calcium (métal bivalent) est l'électrolyte le plus abondant de l'organisme **(Haynes et al., 2012)**. Le calcium joue un rôle important en dehors de l'ossification, dans la conduction neuromusculaire, la coagulation, la perméabilité des membranes cellulaires, l'activation de certaines enzymes et l'action de nombreuses hormones **(Ghosh et Joshi, 2008)**.

C'est un électrolyte essentiel des fluides biologiques (sang, urine, sperme) et de diverses cellules. Il est un constituant constant de toute cellule animale ou végétale et se trouve en quantités importantes dans les noyaux cellulaires. Dans le plasma, le calcium se trouve sous deux formes, soit lié à des protéines (albumine), soit libre sous forme ionisée **(Ngwa et Ambé, 2013)**. Il est présent en grande quantité dans le tissu osseux et est indispensable au développement normal du squelette. Par ailleurs, le calcium joue un rôle important à l'état ionisé dans la perméabilité cellulaire, l'excitabilité neuromusculaire et l'activation de certains systèmes enzymatiques, notamment la coagulation. Son métabolisme est étroitement lié à celui des phosphates. Le Ca²⁺ intracellulaire intervient dans la perméabilité membranaire aux ions, la libération des médiateurs chimiques dans les relais synaptiques et la contraction musculaire **(Haynes et al., 2012)**.

L'organisme contient 1 kg de calcium dont 99 % se trouve dans les os, le cartilage et les dents. Le reste 1 % est situé dans les tissus mous (10 g intracellulaire et 1 g extracellulaire) (**Blaine et al., 2014**). Dans le sérum, sa proportion normale est de 90 à 110 mg/L (2,25 à 2,65 mmol/L) (**Yapo et al., 1990**). Contrairement au calcium osseux, la pénétration du calcium intracellulaire et sa répartition entre cytoplasme et mitochondrie sont sous dépendance hormonale et vitaminique (PTH-Vit D). Trois hormones régissent l'homéostasie calcique. Deux sont hypercalcémiantes, la parathormone et la vitamine D (existe sous deux formes) et la troisième est hypocalcémiante, la calcitonine. Ainsi par exemple, une hypocalcémie entraîne la sécrétion de la PTH. Le transfert de calcium à l'intérieur du cytoplasme peut se faire, soit par une protéine de transport qui est la Ca-binding protein dont la synthèse est favorisée par la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ et soit par inclusion dans une vésicule. Le transport hors de la cellule vers le sang se fait contre le gradient de concentration grâce à une pompe activée par le calcium, Na^+/ATP -dépendante au niveau de la membrane basale latérale. Si l'apport calcique est normal ou faible, le mode d'absorption serait plutôt actif donc saturable et sous dépendance de la vitamine D (par son action sur la synthèse de la Ca-binding protéin). En cas d'apport important de calcium, le transport serait passif, non saturable.

La réabsorption du calcium se fait au niveau du tube distal du néphron sous l'influence régulatrice de la parathormone (**Ghosh et Joshi, 2008**).

- Métabolisme du phosphore

Le phosphore est le second minéral essentiel après le calcium dans l'organisme humain. Il est aussi présent dans les os, le liquide extracellulaire, les tissus mous, et les érythrocytes. Le sérum et le plasma ont les faibles teneurs en phosphore de tout l'organisme et il y est sous deux formes dont le phosphate inorganique et le phosphate organique (phospholipide et ester phosphorique) (**Raina et al., 2012**). Le phosphore inorganique est essentiel pour de nombreuses fonctions physiologiques normales, y compris le développement du squelette, le métabolisme minéral, le transfert d'énergie par le métabolisme mitochondrial, la teneur et la fonction des phospholipides de la membrane cellulaire, la signalisation cellulaire et même l'agrégation plaquettaire (**Moe, 2008**).

Le phosphore joue un rôle important dans de nombreux processus biologiques et biochimiques notamment la synthèse d'adénosine-triphosphate (ATP), et de la 2,3 - diphosphoglycérate (2,3 - DPG) qui régule la dissociation de l'oxygène de l'hémoglobine (**Bazydlo et al., 2014**). Il possède différents rôles dans l'organisme et est essentiel pour le fonctionnement du cerveau, car il participe à la formation des cellules nerveuses. Aussi, le

métabolisme des graisses et des sucres ainsi que la formation d'ATP nécessitent la présence du phosphore. L'énergie nécessaire aux cellules de l'organisme en est alors extrêmement dépendante. Il aide également à maintenir l'équilibre acido-basique des cellules de l'organisme. L'absorption du phosphore se déroule majoritairement au niveau de l'intestin grêle de manière passive, mais également par transport actif. Le phosphore est présent dans les phosphoprotéines, les phospholipides, les acides nucléiques, l'ATP, etc. **(Reinhardt et al., 1988)**. L'absorption digestive est essentiellement jéjunale et s'effectue grâce à un mécanisme de transport actif en présence d'ions calcium et sodium. La réabsorption du phosphore se fait au niveau du tube proximal du néphron sous la dépendance de parathormone qui favorise l'élimination de celui-ci par l'inhibition de sa réabsorption tubulaire. Le phosphore est régulé par le Fibroblast - Growth - Factor 23 (FGF - 23) (inhibe la conversion de la 25-hydroxyvitamine D₃ en 1,25-dihydroxyvitamine D₃ dans les tubes rénaux, ce qui crée une carence relative en vitamine D₃ active) et la parathormone (PTH) **(Berndt et Kumar, 2009)**.

Dans l'organisme humain environ 80 à 90 % du phosphore présent dans les os et les dents provient de l'hydroxyapatite [Ca₁₀(PO₄)₆ (OH)₂] **(Calvo et Uribarri, 2013)**. Dans le corps, la majorité de phosphore est dans l'os. Les niveaux sériques de phosphate (Pi) constituent, 1 % du total de phosphore corporel **(Blaine et al, 2014)**. Dans le sérum, sa valeur normale est de 28 mg /L à 45 mg/L (1,1 à 2,0 mmol/L) **(Yapo et al., 1990)**.

Contrairement au calcium, le phosphore ne possède pas d'hormones régulatrices propres. Cependant, les métabolismes sont étroitement liés, et toute modification de l'homéostasie calcique aura une action sur l'homéostasie du phosphore. La quantité de phosphore absorbée est proportionnelle à la quantité dans la ration. Il y a un important recyclage salivaire de phosphate inorganique (Pi). Par conséquent, les facteurs diminuant l'absorption de Pi de la ration gênent aussi l'absorption de Pi issu de la salive. L'intestin grêle est le site majeur de l'absorption de phosphore. De nombreux éléments comme le Ca²⁺, Mg²⁺, Al³⁺, Fe²⁺, forment des complexes inabsorbables avec le phosphore. Des quantités importantes de ces éléments dans la ration peuvent diminuer l'absorption du phosphore **(Reinhardt et al., 1988)**. La PTH stimule la production de 1,25 (OH)₂ D₃ qui augmente l'absorption intestinale de phosphore **(Goff, 2000)**. Une teneur plasmatique faible de phosphate organique (PO₄) augmente la synthèse de 1,25 (OH)₂ D₃ indépendamment de la teneur de Ca²⁺. La 1,25 (OH)₂ D₃ augmenterait le transport actif de PO₄. La parathormone augmente la concentration salivaire du phosphore **(Reinhardt et al., 1988)**. En cas d'hypophosphatémie seule, la PTH n'est pas sécrétée. Cependant, en cas d'hypocalcémie, la PTH entraîne une augmentation de l'élimination salivaire et urinaire de phosphore. Le calcium et le phosphore sont liés dans le cristal

d'hydroxyapatite. Une hypophosphatémie générée par la parathormone facilite la dissociation des sels Ca-P et déplace l'équilibre de la réaction de formation de l'hydroxyapatite en faveur de la dissociation. Elle favorise la libération du calcium et donc régulation de la calcémie (**Goff, 2000**).

➤ **Vitamine D₃ et voies de signalisation**

La vitamine D₃ joue un rôle dans de nombreuses voies de signalisation (**Nakai et al., 2014**). Il y a les voies non génomique (**Nemere et al., 2010**) et génomique (**Pawlowska et al., 2016**).

• *Voie non génomique*

Dans cette voie, la vitamine D₃ agit à travers des récepteurs (protéines membranaires) dont la Protein disulfide isomerase family a member 3 (Pdia 3) également appelée ERp 57, la Glucose-Regulated Protein 58 (GRP 58) ou Membrane Association Rapid Response Steroid (MARRS). Ceux-ci, en se liant à la membrane et aux seconds Messagers, déclenchent une série de systèmes de transduction (**Nemere et al., 2010**). Dans de nombreux types de cellules comme les kératinocytes, les entérocytes, les cellules musculaires et les ostéoblastes, la 1,25 (OH)₂ D₃, en se fixant au récepteur Pdia 3, active l'influx de calcium cellulaire et sa libération intracellulaire. De même, elle module ou stimule la Protéine Kinase C (PKC), l'adénylate cyclase, les phospholipases A2 et C ou la protéine activée par un mitogène (Mitogen-Activated Protein kinase (MAP kinase)) (**Landrier, 2014**). Certaines actions non génomiques de la 1,25-dihydroxyvitamine D₃ se produisent à travers des récepteurs de la vitamine D ancrés à la membrane, comme c'est le cas de la 1,25-dihydroxyvitamine D₃ associée au MARRS. La MARRS est située dans les radeaux lipidiques des membranes et peut activer différentes kinases, phosphatases et canaux ioniques (**Nemere et al., 2010**) (**Figure 8**). **Chen et al. (2013)** ont cependant montrés l'implication du VDR dans cette voie de signalisation rapide, confirmant ainsi le rôle central de VDR dans la médiation des effets de la vitamine D₃.

• *La voie génomique*

La régulation de l'expression des gènes du VDR se fait à plusieurs niveaux et comprend des influences environnementales, ainsi que des mécanismes génétiques et épigénétiques. Les facteurs environnementaux dont le régime alimentaire, l'exposition au soleil, la pollution et les infections régulent la synthèse du VDR surtout en modulant le niveau de la vitamine D₃ (**Pawlowska et al., 2016**) (**Figure 8**).

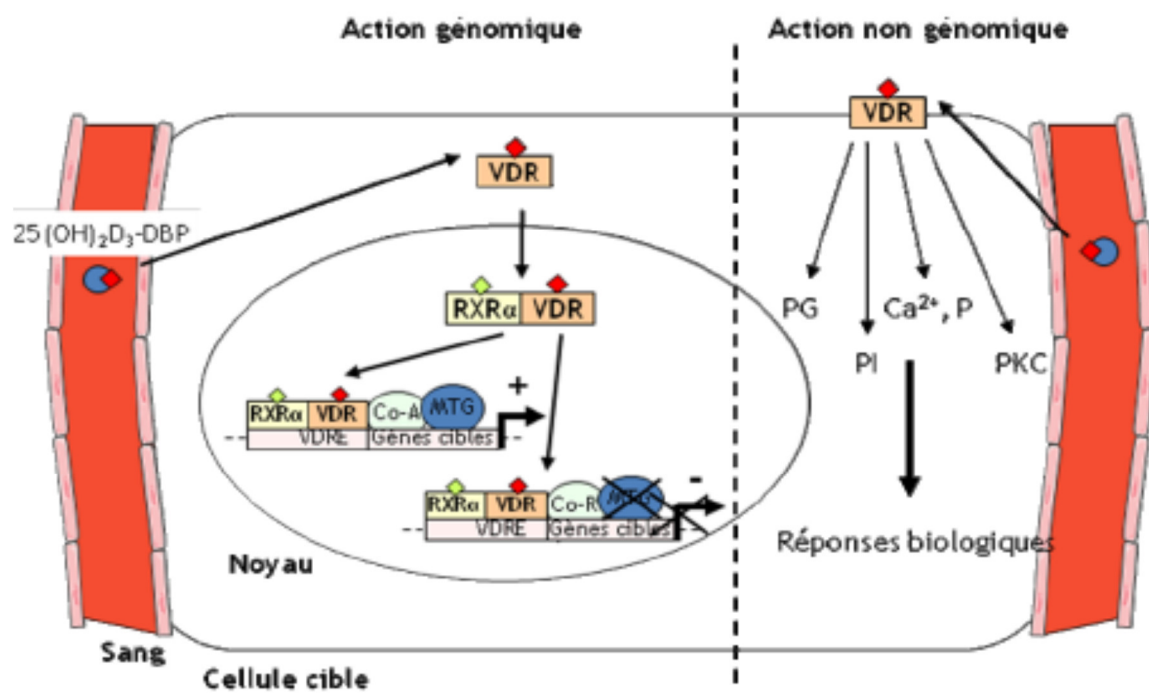


Figure 8 : Voies de signalisations non génomique et génomique de la forme active de la vitamine D₃ (Tissandié *et al.*, 2006)

La liaison de la vitamine D₃ à son récepteur (VDR) entraîne une action génomique, et étant donnée l'ubiquité de ce récepteur, cette action se porte sur un nombre important de gènes. En effet, presque tous les tissus de notre organisme expriment le VDR, plus de 3 % de nos gènes sont modulés par le calcitriol (Coxam *et al.*, 2014). La régulation des actions génomiques de la vitamine D₃ associée à son récepteur est multifactorielle, et de ce fait très complexe. Par ailleurs, la liaison de la 1,25 (OH)₂ D₃ au VDR et son acheminement vers le noyau de la cellule dépend du type cellulaire et de sa composition. La concentration en calcitriol et en VDR varie d'une cellule à l'autre, il en est de même pour la protéine de transport intracellulaire de la vitamine D (IDBP, Intracellular vitamin D Binding Protein) qui module le trafic intracellulaire de la vitamine ainsi que la vitesse d'association entre son récepteur et elle. D'autre part, plusieurs domaines du VDR influencent son association au RXR dans le noyau cellulaire.

Cette hétérodimérisation dépend premièrement du LBD (Ligand Binding Domain), son intégrité est indispensable à la fusion VDR-RXR. De plus, le DBD (DNA-Binding Domain) par lequel le VDR se lie à l'ADN des gènes cibles présente deux motifs en doigts de Zinc, qui lui permettent de s'attacher aux VDRE (Vitamin D response element). Il existe plusieurs types de VDRE. Certains induisent la transcription des gènes, alors que d'autres au contraire l'inhibent. Enfin, le domaine d'hétérodimérisation avec le RXR et le domaine AF2 du VDR font entrer en jeu des corégulateurs. Le domaine AF2, par exemple, permet le recrutement de protéines interagissant avec le VDR comme des composants du complexe d'initiation de la transcription, l'ARN polymérase II ou des co-activateurs de transcription, qui modifient la chromatine et induisent la transcription des gènes. A l'inverse, certains corépresseurs empêchent l'exposition de la chromatine et inhibent ainsi la transcription (Dusso *et al.*, 2005).

➤ Vitamine D₃ et système immunitaire

Le rôle potentiel de la vitamine D₃ et de son métabolite actif 1,25 (OH)₂ D₃ dans la modulation de la réponse immunitaire a longtemps été reconnu depuis la découverte des récepteurs de la vitamine D (VDR) dans les macrophages, les cellules dendritiques (CD) et les lymphocytes (Adorini, 2005 ; White, 2008). La totalité de la réponse immunitaire implique les deux types de réponses (innée et adaptative) (Figure 9) dans des interactions complexes faisant intervenir de nombreuses cytokines (Pedersen *et al.*, 2011).

- *Vitamine D₃ et Immunité innée*

Les cellules actrices de cette réponse immunitaire sont les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules tueuses naturelles [Natural Killer cells (NK)] ainsi qu'un

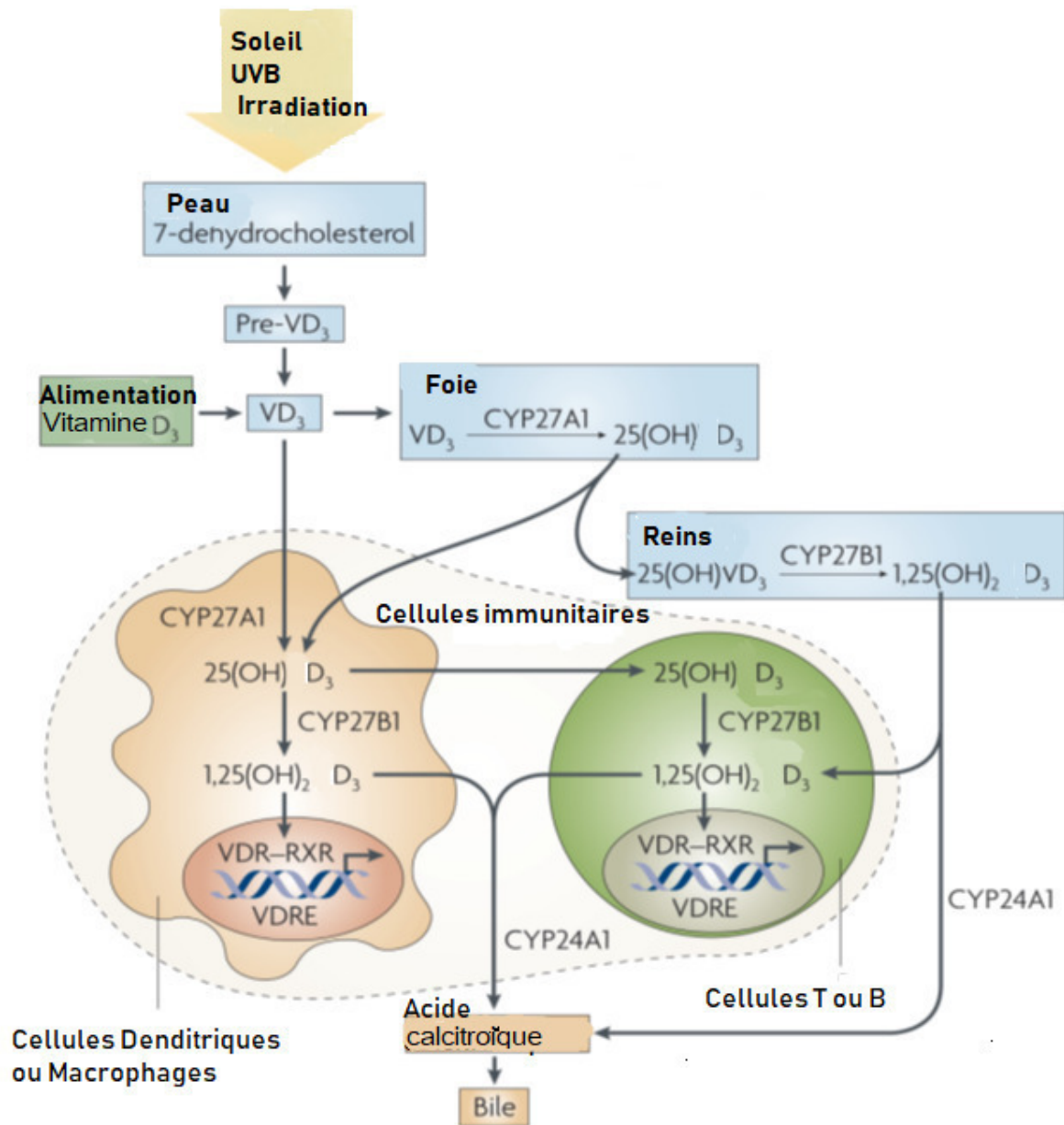


Figure 9 : Métabolisme de la vitamine D₃ dans les cellules du système immunitaire humain (Mora *et al.*, 2008)

certain nombre de cellules épithéliales comprenant celles de l'épiderme, de la gencive, de l'intestin, du vagin, de la vessie et des poumons (**Bikle, 2011**). Dans les monocytes et les macrophages, l'interféron gamma (IFN- γ) ou le lipopolysaccharide (LPS de ligand TLR4) favorisent la conversion de la 25 (OH) D₃ en 1,25 (OH)₂ D₃ (**Hewison, 2011**). Cette dernière (1,25 (OH)₂ D₃) stimule les récepteurs TLR (Toll- Like Receptors) présents à la surface des cellules immunitaires afin de reconnaître des motifs associés aux pathogènes (Pathogen Associated Molecular Pattern ou PAMP) (**Viard, 2015**) pour le détruire.

De plus, dans des conditions de stimulations, les monocytes et les macrophages expriment de faibles niveaux de CYP24A1, l'enzyme catabolique de la vitamine D₃ (**Bikle, 2011**). La vitamine D₃ agit donc dans ce cas non seulement par une action endocrine, mais aussi par effet intracrine. Ce système subit un rétrocontrôle négatif qui permet d'éviter un état inflammatoire trop important. Ainsi, le calcitriol inhibe les TLR après leur activation et le début de la réaction (**Viard, 2015**). La 1,25 (OH)₂ D₃ diminue la maturation des cellules dendritiques (DC), l'inhibition de la régulation positive de l'expression du CMH de classe II, CD40, CD80 et CD86. De plus, elle diminue la production d'IL-12 par des DC tout en induisant la production d'IL-10 (**Gauzzi et al., 2005**) (**Annexe 6**).

- *Vitamine D₃ et Immunité adaptative*

À la différence de l'immunité innée, l'immunité adaptative est lente à se mettre en place. Les cellules qui y sont mises en jeu sont, d'une part, les lymphocytes T (effecteurs et régulateurs) (**Kroner et al., 2015**) et, d'autre part, les lymphocytes B (**Lang et al., 2013**).

Parmi les lymphocytes T effecteurs, on trouve :

- les Th1, qui synthétisent l'interleukine 2 (IL-2), le Tumor Necrosis Factor (TNF) et l'interféron (IFN), à réponse cellulaire;
- les Th2, qui synthétisent l'IL-3, l'IL-4, IL-5 et l'IL-10, à réponse humorale;
- les Th17, qui synthétisent l'IL-17 et l'IL-6, impliqués dans la régulation des maladies auto-immunes.

Les lymphocytes T régulateurs sécrètent l'IL-10, la cytokine anti-inflammatoire, et en régulant la réponse induite par les lymphocytes T effecteurs, permettent d'empêcher les inflammations excessives (**Gil et al., 2018**).

La vitamine D₃ inhibe les lymphocytes Th1 et Th17 mais favorise les lymphocytes T régulateurs et les Th2. De ce fait, elle apparaît comme un frein aux réponses inflammatoires excessives (**Bikle, 2011**). Dans les lymphocytes T, la 1,25 (OH)₂ D₃ diminuent la production d'IL-2, d'IL-17 et d'interféron gamma (IFN γ) et atténue l'activité cytotoxique et la prolifération

des lymphocytes TCD4⁺ et CD8⁺. La 1,25 (OH)₂ D₃ pourrait également favoriser le développement des lymphocytes T de type 1 (TR1) produisant de l'IL-10, ce qui supprime le développement des autres sous-classes Th (**Sakaguchi et al., 2008**) (**Annexe 6**).

Les lymphocytes B possèdent le VDR, ainsi que le CYP27B1 permettant un effet intracrine du calcitriol, qui inhibe la prolifération de ces cellules et leur production d'anticorps (**Lang et al., 2013**). Enfin, la 1,25 (OH)₂ D₃ bloque la prolifération des lymphocytes B, la différenciation des cellules plasmiques et la production d'immunoglobulines et les cellules ASC (adipose derived stroma/stem cells) sécrétant les anticorps (**Bikle, 2011**) (**Annexe 6**).

III.2.1.4. Vitamine D₃ et pathologies

La vitamine D₃ est impliquée dans plusieurs processus pathologiques (**Holick, 2007**).

➤ **Vitamine D₃ et infection à virus de l'immunodéficience humaine**

Des études ont mis en évidence le rôle de la vitamine D₃ au cours de l'infection à VIH (**Prentice et al., 2009**). En effet, le calcitriol induit également la production et la prolifération des NK. Ces cellules provoquent l'autophagie des macrophages, un mécanisme de défense antivirale inhibé lors de l'infection à VIH. La réplication intracellulaire du VIH pourrait donc être limitée par ce mode de défense de l'organisme, dépendant de la vitamine D₃ (**Viard, 2015**). Cependant, de faibles concentrations de 25 (OH) D₃ et de 1,25 (OH)₂ D₃ ont été observées parmi les personnes infectées par le VIH (**Prentice, 2009**). Cette hypovitaminose D₃ fréquente au cours de l'infection à VIH et même en dehors du traitement antirétroviral, serait due en partie à l'inhibition de l'hydroxylation au niveau rénal par les cytokines proinflammatoires (TNF α) synthétisées abondamment au cours l'infection à VIH (**Haug et al., 1998**). La progression de l'infection à VIH est aussi associée à la moindre exposition solaire et donc à un bas niveau vitamine D₃ (**Mansueto et al., 2015**). L'apport alimentaire en cette vitamine déjà presque négligeable est ici souvent perturbé par une malabsorption fréquente lors de l'infection à VIH (**Khazai et al., 2009 ; Giacomet et al., 2013**).

Par ailleurs, chez des patients infectés par le VIH1 sans syndrome de l'immunodéficience acquise (sida), on a observé des niveaux normaux de 25 (OH) D₃. Cependant, ces niveaux sont fortement réduits pendant la progression de la maladie et directement corrélés à la survie (**Haug et al., 1998**). En effet, de faibles niveaux de vitamine D₃ pourraient prédisposer les patients infectés par le VIH à un syndrome inflammatoire de reconstitution immunitaire (IRIS) et à une infection opportuniste (IO) étant donné que la 1,25 (OH)₂ D₃ a une activité anti-inflammatoire et intervient dans la régulation des fonctions des

cellules T humaines et des cellules présentatrices d'antigène (APC) (**Conesa-Botella et al., 2009 ; Bikle, 2011**). La vitamine D est utilisée lors de la différenciation des cellules du système immunitaire qui subissent un renouvellement plus important lors de l'infection par le VIH (**Holick, 2004**). Elle régule les voies impliquées dans la destruction des pathogènes intracellulaires et module les cellules T, les cytokines et les cellules dendritiques (**Havers et al., 2014b**). En effet, la déficience ou l'insuffisance en vitamine D précipiterait la destruction des CD4 et la progression de la maladie (**Welz et al., 2010**). Les complications infectieuses résultant d'une mauvaise immunité (en-dessous de 200 cell/mm³) nécessitent une hospitalisation, ce qui réduit considérablement la durée d'exposition au soleil pour les patients (**Mansueto et al., 2015**). De plus, un faible niveau de 25 (OH) D₃ pourrait également jouer un rôle dans la gravité des infections et des tumeurs malignes des patients infectés par le VIH (**Lake et Adams, 2011**).

Les médicaments utilisés dans le traitement du VIH peuvent inhiber ou stimuler les enzymes du cytochrome P450 (**Prentice, 2009**). L'interaction des métabolites de la vitamine D₃ avec le système du cytochrome P450 est essentielle à la contribution potentielle du traitement antirétroviral au déficit en vitamine D₃ chez les patients infectés par le VIH (**Lake et Adams, 2011**). Par ailleurs, le traitement antirétroviral par les inhibiteurs de la protéase (IP) et les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) agissent sur le métabolisme de la vitamine D₃ (**Stone et al., 2010**). En effet, les IP et les INNTI interfèrent avec les cytochromes impliqués dans le métabolisme de la vitamine D (par exemple le INNTI induit le CYP3A4, les IP inhibent le CYP3A4) (**Yamamoto et al., 2009**). C'est le cas des patients traités essentiellement avec la Névirapine ou l'Efavirenz, chez qui des taux de vitamine D₃ insuffisants (< 30 ng/mL) ont été rencontrés. Ceci peut s'expliquer par l'effet inducteur enzymatique de ces molécules sur le cytochrome P450 en modifiant l'hydroxylation de la 25-hydroxyvitamine D₃ dans le foie et l' α -hydroxylation dans le rein. Les INNTI ont aussi une action activatrice de la 24-hydroxylase accélérant ainsi le catabolisme de la vitamine D₃. Les IP favorisent également une hypovitaminose D₃ car ils sont fortement inhibiteurs du cytochrome P450 et des enzymes 25- hydroxylase et 1- α -hydroxylase (**Stone et al., 2010**). Bien que la carence en vitamine D₃ dans la progression du sida n'a pas été liée au dysfonctionnement de la 1- α -hydroxylase, il a été décrit que les inhibiteurs de protéase utilisés dans le traitement de patients infectés par VIH1 interfèrent avec le métabolisme de la vitamine D₃ en inhibant les activités de la 25-hydroxylase, 24- hydroxylase et 1- α -hydroxylase (**Cozzolino et al., 2003 ; Laplana et al., 2014**). L'effet des INNTI sur le métabolisme de la vitamine D₃ est mal connu, mais les interactions sont peu

probables car les NRTI ne sont pas métabolisés par les cytochromes (**Conesa-Botella et al., 2010**).

➤ **Vitamine D₃ et autres pathologies**

La vitamine D₃ est essentielle pour de multiples processus physiologiques dans l'organisme (**Figure 10**) et son niveau approprié dans le corps est essentiel. Une carence grave en vitamine D₃ conduit au rachitisme, car la vitamine D₃ est essentielle pour la régulation de l'absorption du calcium et des phosphates, et donc pour le métabolisme osseux normal (**Civitelli et Ziambaras, 2011**).

Un bon état de vitamine D₃ est également important pour la fonction musculaire (**Moreira-Pfrimer et al., 2009**). En outre, certains résultats suggèrent que la vitamine D₃ peut réduire la destruction des cellules bêta pancréatiques et de cette façon, il peut prévenir les cas de diabète auto-immun (**Zittermann et Gummert, 2010**).

Dans le système cardio-vasculaire, la vitamine D₃ réduit la pression systolique et diastolique. La pression artérielle chez les sujets hypertendus et le taux élevé de vitamine D₃ est associée à une réduction de 50 % de risque de mortalité cardiovasculaire (**Witham et al., 2009**).

La vitamine D₃ peut également être importante pour une fonction adéquate du système nerveux. L'incidence de la sclérose en plaques (SP) était également corrélée avec l'état de la vitamine D₃. Un taux élevé de vitamine D₃ était associé à une moindre incidence de la SP et à un statut de la vitamine D₃ corrélée à une incidence plus élevée de cette maladie (**Munger et al., 2006**).

De nombreuses études décrivent le lien entre les carences en vitamine D₃ et le diabète sucré, l'hypertension et la dyslipidémie (**Zhang et Naughton, 2010**). De plus, de faibles concentrations de vitamine D₃ ont été observées dans des néoplasmes, par exemple le cancer de la prostate, le cancer du côlon, le cancer du sein (**Nieto et al., 2004 ; Gichuhi et al., 2014**).

III.2.1.5. Différentes méthodes de dosage de la 25-Hydroxyvitamine D₃

Les premières méthodes de routine pour la mesure des concentrations de 25 (OH) D₃ dans le plasma humain étaient basées sur une protéine compétitive et une protéine de liaison à la vitamine D₃ utilisée et un traceur marqué au tritium. Ces méthodes ont été remplacées par un dosage radioimmunologique (RIA) plus simple et plus rapide. En 1993, un traceur radio-daté a été incorporé au RIA. Ce principe d'analyse est à la base de plusieurs méthodes disponibles dans le commerce (**Turpeinen et al., 2003**). Les progrès récents dans la recherche sur la

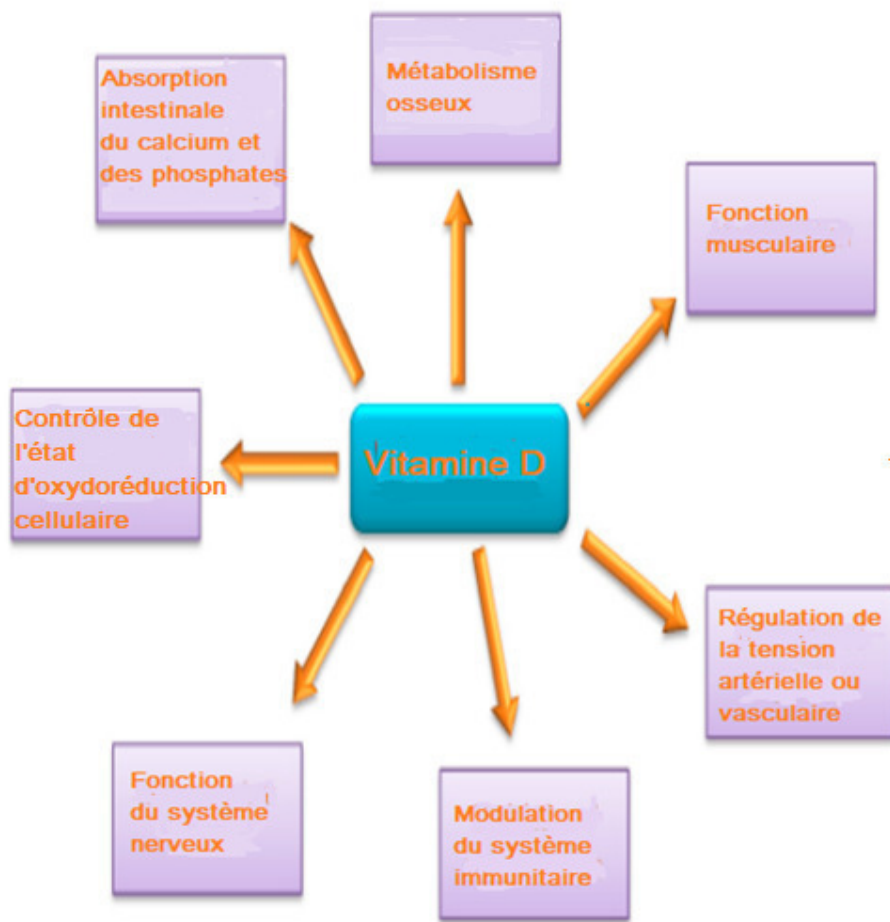


Figure 10 : Multiples fonctions de la vitamine D₃ (Pawlowska *et al.*, 2016)

vitamine D₃ ont donné une série de techniques pour évaluer le statut de la vitamine chez les humains en quantifiant la 25-hydroxyvitamine D₃, le biomarqueur convenu (Holick, 2007). De tels tests comprennent des techniques chromatographiques, à savoir la spectrométrie de masse en tandem (MS) (Thibeault *et al.*, 2012) et la chromatographie liquide de haute performance (CLHP) avec une détection ultraviolette (UV) (Kandar et Zakova, 2009), ainsi qu'un dosage enzymatique, un dosage radioimmunologique (RIA) et immunodosages de chimioluminescence (Lensmeyer *et al.*, 2006).

La méthode de référence pour le dosage des vitamines liposolubles est la chromatographie liquide de haute performance (CLHP ou HPLC) (Annexe 7). Cette technique nécessite en effet une préparation moins fastidieuse des échantillons et des conditions de température de colonne moins élevées, évitant ainsi la perte de composés labiles (Catignani et Bieri, 1983 ; Abidi et Mounts, 1997). Elle est caractérisée par sa capacité à quantifier individuellement les deux formes de la vitamine (25 (OH) D₃ et 25 (OH) D₂) (Maaty *et al.*, 2015). La CLHP ou HPLC a pour but plus qu'une analyse quantitative que qualitative car il paraît difficilement envisageable de balayer tout l'intervalle de longueurs d'onde accessible pour détecter n'importe quel produit contenu dans la solution étudiée.

➤ *Principe*

Le principe de la chromatographie est basé sur la séparation d'un mélange de composés purs qui sont visualisés sous forme de pics, par interaction différenciée avec un support. L'échantillon est véhiculé par la phase mobile qui est un mélange de solvants, et séparé sur la phase stationnaire qui est un composé chimique greffé sur la silice et renfermé dans une colonne (Lindroth et Mopper, 1979).

➤ *Applications*

La chromatographie liquide haute de performance est très utilisée dans tous les domaines de la chimie analytique. Elle permet l'analyse soit de substances thermiquement instables, puisque l'opération s'effectue à température ambiante, soit de substances peu volatiles de masse moléculaire pouvant atteindre 2000 g/mol, soit encore de substances ionisées. C'est une méthode "douce" avec les molécules. Les molécules d'intérêt biologique comme les vitamines, les sucres et les acides aminés peuvent être analysées directement sans passer par la formation de dérivés, et la séparation de protéines et de polymères synthétiques peut être réalisée, même si leur masse est élevée.

➤ ***Description et fonctionnement des organes***

Dans toute CLHP, on retrouvera toujours les éléments de base suivants :

- Un ou plusieurs réservoirs

Ils contiennent une phase mobile contenant, soit des solvants purs, soit des mélanges de solvants dans des concentrations connues.

- Une pompe

Elle force la phase mobile à traverser la colonne dont la phase fixe est très compacte.

- Un système d'injection

Il comporte une boucle d'échantillonnage calibrée (généralement une vanne RHEODYNE). C'est un injecteur à boucles d'échantillonnage. Le système de la boucle d'injection permet d'avoir un volume injecté constant, ce qui est important pour l'analyse quantitative.

- Une colonne

Elle est la partie active du système, c'est elle qui joue le rôle prépondérant. La colonne est un cylindre calibré de quelques centimètres de long généralement en acier inoxydable parfois doublé d'un matériau inerte (verre ou plastiques spéciaux).

- Un détecteur

Il permet à la fois de mettre en évidence la sortie des solutés de la colonne et de donner un signal proportionnel à la quantité de chacun de ces solutés dans un mélange. Les détecteurs font le lien entre le phénomène physico-chimique et sa représentation visuelle qui en permet l'étude.

- Un ordinateur ou un intégrateur

Il permet de récupérer toutes les données issues des détecteurs, tracer les chromatogrammes, intégrer la surface des pics, imprimer un rapport d'analyse donnant les temps de rétentions et les surfaces de chaque pic.

IV. PARATHORMONE

IV.1. DEFINITION, ORIGINE, STRUCTURE ET METABOLISME

IV.1.1. Définition, origine et structure

La parathormone encore appelée hormone parathyroïdienne, est une hormone hypercalcémiant qui joue un rôle très important dans l'homéostasie phosphocalcique (**Thibeault *et al.*, 2012**). La parathormone est une hormone peptidique monocaténaire de 84 acides aminés (**Annexe 8**), produite par quatre glandes parathyroïdiennes qui sont situées dans le cou, à côté de la glande thyroïde. Elle est mise en réserve dans des vésicules de stockage. Cette hormone a été décrite pour la première fois par Collip en 1925, purifiée et isolée pour la première fois en 1959 (**Rasmussen et Craig, 1959**). L'hormone intacte pèse 9500 Dalton. Elle comprend trois zones dont une extrémité amino-terminale, une zone intermédiaire et une extrémité carboxyl-terminale (**Houillier, 2008**). Chez l'homme, le gène qui code pour la parathormone est situé sur le bras court du chromosome 11 (**Zabel *et al.*, 1985**).

IV.1.2. Métabolisme

➤ **Biosynthèse**

Dans les cellules parathyroïdiennes, le gène codant pour la parathormone est situé sur le chromosome 11. Il est transcrit en un précurseur d'ARN messager (ARNm). Des remaniements de ce précurseur donnent naissance à l'ARNm, qui passe alors dans le cytoplasme. Cet ARNm est traduit dans les ribosomes du réticulum endoplasmique granuleux (REG) en un premier précurseur qui est la pré- parathormone, une molécule de 115 acides aminés, et de poids moléculaire 13000 D. Ce polypeptide traverse la paroi du REG et est transformé rapidement en un deuxième précurseur qui est la parathormone. La parathormone, composé de 90 acides aminés, migre dans l'appareil de Golgi et subit un dernier clivage enzymatique, donnant naissance à la parathormone (PTH) active 1-84 N-terminale (**Zabel *et al.*, 1985**) (**Figure 11**).

➤ **Sécrétion et catabolisme**

De l'appareil de Golgi se détachent des grains de sécrétion dans lesquels la PTH est stockée, puis sécrétée. Cette sécrétion a lieu soit au niveau des cellules principales qui possèdent l'appareil cellulaire nécessaire, selon les variations de la calcémie par exocytose (**Habener *et al.*, 1984**), soit produites par son métabolisme périphérique. L'élimination de la parathormone est faite dans les cellules parathyroïdiennes qui la produisent, et est due à deux mécanismes, soit les granules sécrétoires se lient à des lysosomes pour dégrader complètement la PTH, soit elle est clivée par des cystéine-protéases pour générer des fragments C-terminaux (**D'Amour, 2012**). Ce phénomène est régulé par la calcémie. En présence d'une hypocalcémie, la PTH synthétisée reste intacte et est libérée dans la circulation sanguine, qui ensuite, est rapidement

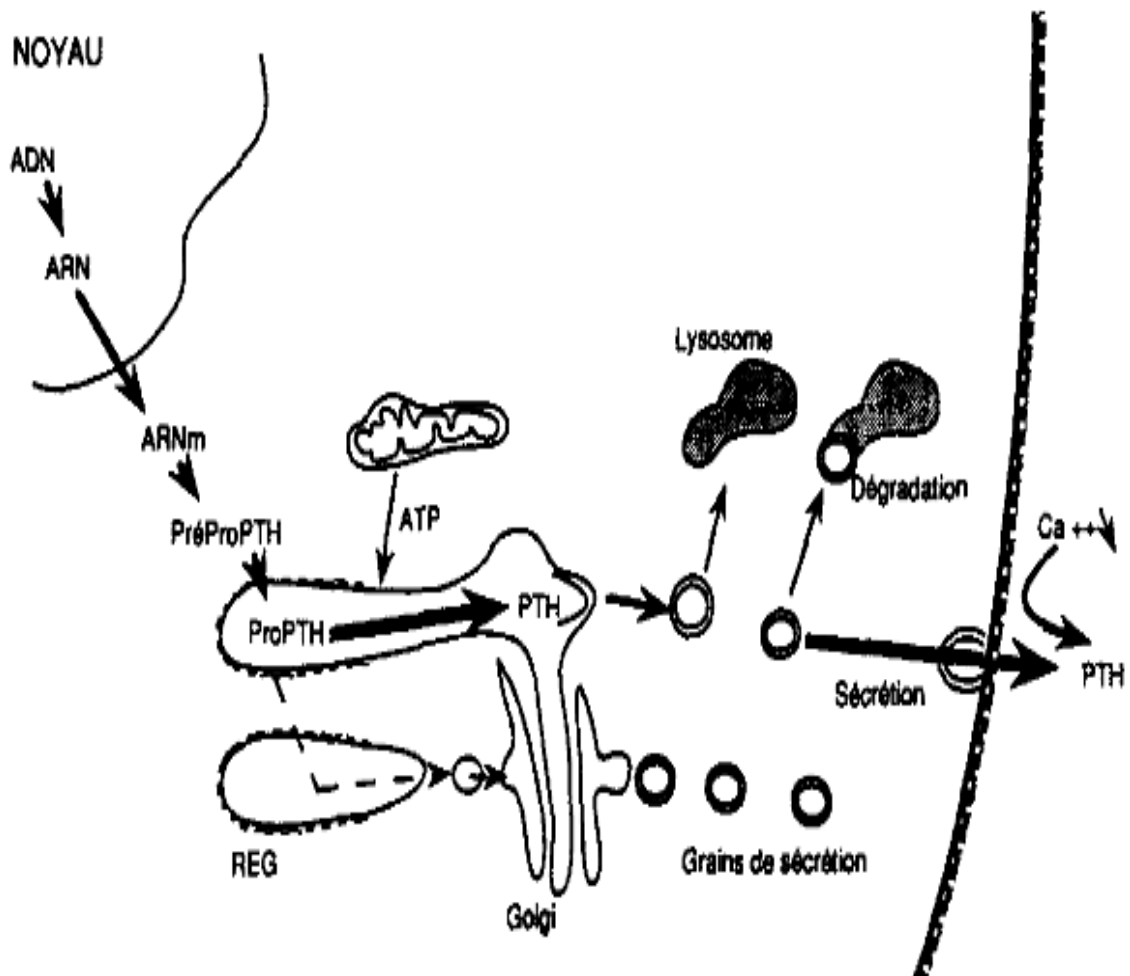


Figure 11 : Biosynthèse de la parathormone (Zabel *et al.*, 1985)

éliminée. Sa demi-vie plasmatique est inférieure à 4 minutes. En cas d'hypercalcémie, elle est majoritairement dégradée. Le catabolisme est aussi extra-parathyroïdien (**Bernard-Poenaru et Guéris, 1996**).

Au niveau hépatique, le métabolisme de la PTH emprunte deux voies dont une voie relative à la PTH intacte, ayant lieu dans les cellules de Kuppfer, qui libère dans la circulation sanguine des fragments carboxy-terminaux et l'autre voie qui libère des fragments N-terminaux. Elle a lieu dans les hépatocytes, c'est une voie partiellement inhibée par une baisse de la calcémie. Le foie libère des fragments de PTH de différentes tailles dans la circulation sanguine. La demi-vie des fragments issus du métabolisme (parathyroïdien et hépatique) est plus élevée (20 à 40 minutes) que celle de la PTH intacte (4 minutes maximum pour la PTH intacte) (**Fukagawa et Kazama, 2005**).

Au niveau du rein, la PTH 1-84 intacte et les différents fragments issus du métabolisme rénal sont éliminés. Tous ces peptides (PTH 1-84 et ces différents fragments) ont deux issues possibles : agir sur les organes cibles ou être éliminés par le rein (**Michels et Kelly, 2013**).

IV.2. ROLES BIOLOGIQUES DE LA PARATHORMONE

La parathormone participe au métabolisme du calcium, du phosphate et des os. Elle agit au niveau de plusieurs organes pour accomplir cette tâche. De plus, elle est primordiale pour l'homéostasie osseuse (**Hohenstein et al., 2014**). En effet, la parathormone agit au niveau de 3 organes que sont l'intestin, le rein et l'os (**Figure 12**) (**Quinn et al., 1998 ; Yasuda et al., 1998**). La concentration de PTH est régulée directement par la fraction ionisée de calcium (Ca^{2+}) et de magnésium (Mg^{2+}) plasmatiques. Une diminution de ces dernières entraîne une augmentation de la sécrétion de la PTH, alors qu'une augmentation induit l'effet contraire (**Michels et Kelly, 2013**).

IV.2.1. Au niveau du rein

La Parathormone active la 1-alpha hydroxylase (enzyme), qui permet la transformation de la vitamine D (25-hydroxyvitamine D_3) en son métabolite le plus actif, la 1,25-dihydroxyvitamine D_3 . La vitamine D activée potentialise l'effet de la parathormone à agir en augmentant la réabsorption rénale de calcium, diminuant ainsi la calciurie et favorisant l'excrétion du phosphore, augmentant ainsi la phosphaturie (**Li et al., 2013 ; Hohenstein et al., 2014**).

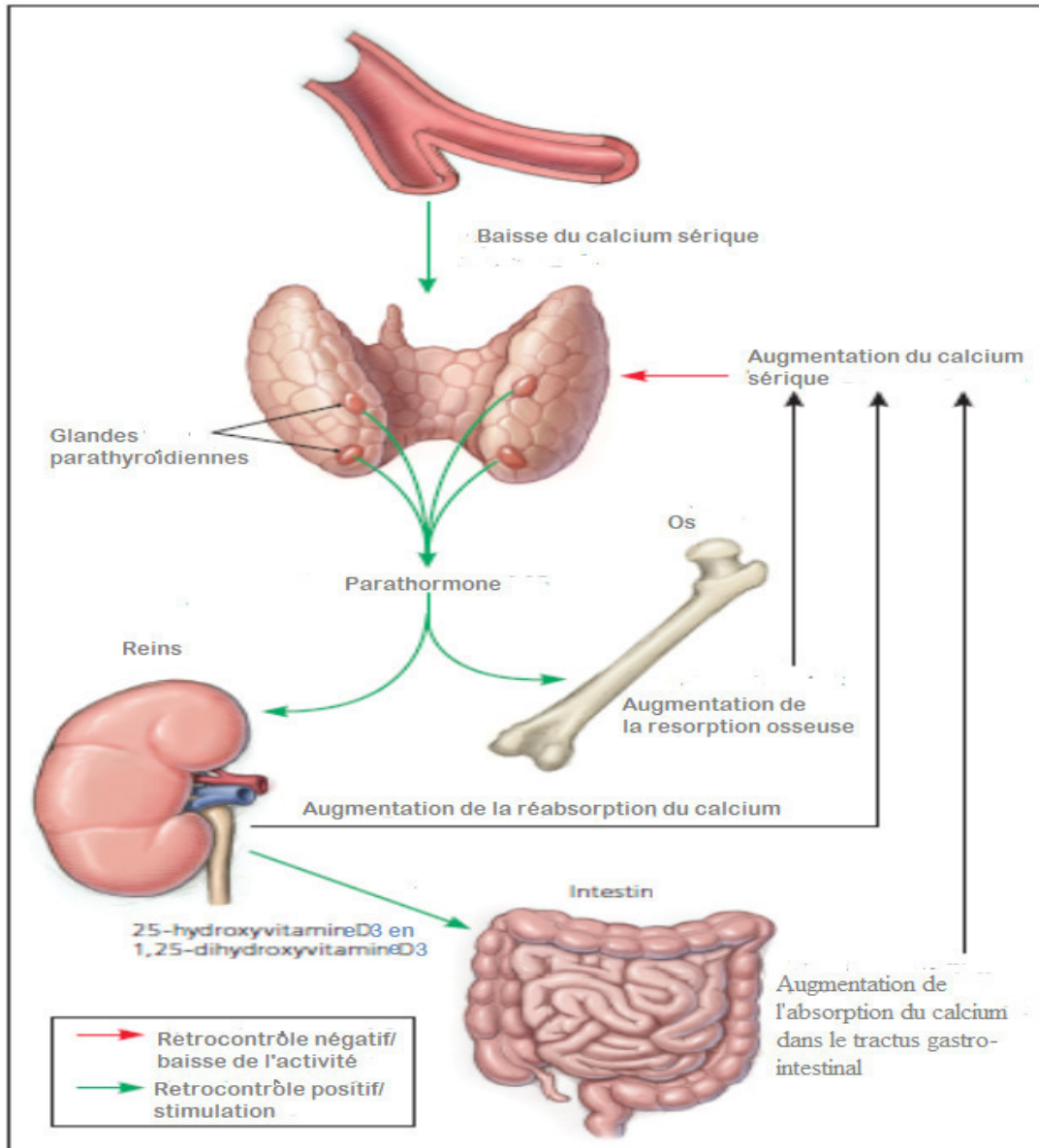


Figure 12 : Action de la parathormone au niveau des différents organes (Shoback, 2008 ; Stack et Randolph, 2010)

IV.2.2. Au niveau de l'intestin

La PTH agit indirectement en augmentant l'absorption intestinale du calcium, via l'action de la 1,25-dihydroxyvitamine D₃, et exerce également un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de la parathormone (**Souberbielle *et al.*, 2002**).

IV.2.3. Au niveau de l'os

La parathormone agit particulièrement sur les récepteurs qui sont situés au niveau des ostéoblastes (**Souberbielle, 2003**). En réponse à une hypocalcémie, la parathormone entraîne une ostéolyse superficielle qui permet la résorption osseuse, libérant ainsi du calcium et du phosphate (**Hohenstein *et al.*, 2014**).

IV.3. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA PARATHORMONE

Les glandes parathyroïdes répondent aux faibles niveaux de calcium sérique en libérant de la PTH, qui est un peptide de 84 acides aminés. La PTH augmente les taux sériques de calcium par action directe sur les os et les reins. Elle stimule les ostéoclastes pour résorber l'os et mobiliser du calcium dans le sang. Dans les reins, la PTH agit pour réduire la clairance du calcium et stimuler la synthèse de la 1,25-dihydroxyvitamine D₃, ce qui stimule l'absorption du calcium dans le tractus gastro-intestinal (**Shoback, 2008 ; Stack et Randolph, 2010**).

Dans leur état normal, les glandes fonctionnent pour maintenir les taux sériques de calcium dans une gamme cohérente et étroitement contrôlée. Les glandes synthétisent et stockent la PTH, ce qui lui permet de répondre en quelques minutes à l'hypocalcémie. L'hypocalcémie soutenue entraîne une réplication cellulaire et une augmentation de la masse des glandes. Le calcium et la 1,25-dihydroxyvitamine D₃ fournissent une réaction négative aux glandes parathyroïdes pour inhiber la libération de PTH. Une glande normale est suffisante pour une sécrétion adéquate de PTH pour maintenir le taux de calcium normal (**Bringham *et al.*, 2003 ; Shoback, 2008 ; Stearns et Cox, 2010**). Les troubles parathyroïdiens les plus fréquemment présents avec des anomalies sériques du calcium sont d'une part l'hyperparathyroïdie primaire, la cause la plus fréquente d'hypercalcémie chez les patients ambulatoires. Elle est souvent découverte accidentellement lors de l'évaluation des taux d'électrolytes sériques (**Stearns et Cox, 2010**). Et d'autre part, l'hyperparathyroïdie secondaire survient le plus souvent en raison de la diminution des niveaux de 1,25-dihydroxyvitamine D₃, d'hyperphosphatémie et d'hypocalcémie dans le contexte d'une maladie rénale chronique. D'autres causes incluent la carence en vitamine D₃ secondaire à la faible consommation

alimentaire, le manque d'exposition au soleil, la malabsorption, la maladie du foie et d'autres maladies chroniques (**Ahmad et Hammond, 2004**).

IV.4. INFECTION A VIH ET PARATHORMONE

Les patients infectés par le VIH ont en général des taux sanguins de vitamine D₃ inférieurs à la normale. L'élévation de la phosphatémie est observée chez les patients VIH positif sous certains antirétroviraux et carencés en vitamine D₃, ce qui entraîne l'élévation du taux de la PTH (**Rosenvinge et al., 2010 ; Welz et al., 2010**). Des études ont indiqué que même une légère réduction du taux sérique de 25 (OH) D₃ peut être associée à une hyperparathyroïdie secondaire, à un renouvellement osseux accru et à une perte osseuse accélérée. Ce qui augmente le risque de fractures osseuses (**Mezquita-Raya et al., 2001 ; Adams et Hewison, 2008**). En effet, le métabolisme de la vitamine D et celle de la parathormone sont liés (**Sai et al., 2011**). Par ailleurs, la supplémentation en vitamine D₃ abaisse les taux de parathormone (PTH) des patients sous certains antirétroviraux (**Havens et al., 2012**). Des niveaux élevés de PTH ont été associés à l'utilisation du ténofovir quel que soit le niveau de vitamine D₃, avec une différence significative par rapport aux patients n'ayant aucune exposition à ce médicament (**Lerma et al., 2012**). Il est à noter qu'une diminution du taux de PTH a déjà été rapportée chez des patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (**Jaeger et al., 1994 ; Cherqaoui et al., 2014**). Le mécanisme pourrait être lié aux anticorps contre les cellules parathyroïdiennes. À l'aide d'anti-Leu3a, un anticorps monoclonal reconnaissant le CD4, il a été constaté que les patients séropositifs présentent une molécule de CD4 à la surface des cellules de la parathyroïde, indiquant la possibilité d'une inhibition fonctionnelle par des anticorps anti-CD4 ou une infection directe par le VIH (**Hellman et al., 1996**). De plus, le TNF- α semble nuire à l'effet de stimulation de la PTH par des mécanismes impliquant une régulation négative des récepteurs de la PTH, une altération de l'activité de la protéine kinase C et une inhibition de la réponse à l'AMPc après stimulation de la PTH (**Haug et al., 1998**).

V. GENERALITES SUR LES RECEPTEURS NUCLEAIRES

En biochimie, un récepteur est une protéine de la membrane cellulaire ou du cytoplasme ou du noyau cellulaire qui se lie spécifiquement à un ligand (neurotransmetteur, hormone, autre substance), induisant une réponse cellulaire à ce ligand. Les modifications du comportement du récepteur protéique induites par le ligand conduisent à des modifications physiologiques qui constituent les « effets biologiques » du ligand.

Il existe différents types de récepteurs en fonction de leur ligand et de leurs fonctions. Certaines protéines réceptrices sont des protéines de la partie externe de la membrane plasmique. De nombreux récepteurs d'hormones et de neurotransmetteurs sont des protéines transmembranaires enchâssées dans la bicouche lipidique des membranes cellulaires. Les récepteurs métabotropes sont couplés aux protéines G et affectent les cellules indirectement par le moyen d'enzymes qui contrôlent les canaux ioniques (**Capeau et al., 1992**).

L'autre classe majeure de récepteurs est constituée par les protéines intracellulaires comme les récepteurs d'hormones stéroïdes (Récepteurs nucléaires). Ces récepteurs peuvent parfois pénétrer dans le noyau de la cellule (petites molécules lipophiles). Ces petites molécules lipophiles contrôlent indirectement de nombreux processus biologiques (reproduction, développement, métabolisme, inflammation, fonctions immunitaires etc.) chez les eucaryotes (**Chawla et al., 2001**).

Les récepteurs nucléaires sont une superfamille de récepteurs agissant comme facteurs de transcription suite à la liaison d'un ligand spécifique conduisant à la régulation de l'expression de gènes cibles. Par exemple, les récepteurs nucléaires peuvent répondre à certains stéroïdes, comme l'œstrogène, et à d'autres molécules de signalisation, comme la vitamine D, l'hormone thyroïdienne et les rétinoïdes. D'un autre côté, la famille des récepteurs nucléaires regroupe également des récepteurs considérés comme des senseurs métaboliques, puisqu'ils sont activés par des phospholipides ou des molécules dérivées du cholestérol (**Nagy et Schwabe, 2004**). Les récepteurs nucléaires sont largement répandus dans le règne animal et semblent être apparus tôt dans l'évolution des métazoaires (**Escriva et al., 1997**). Actuellement, 48 récepteurs nucléaires ont été identifiés chez l'homme. D'un point de vue fonctionnel, il existe trois classes de récepteurs nucléaires dont les récepteurs endocriniens ayant un ligand de forte affinité, les récepteurs nucléaires orphelins « adoptés » possédant un ligand de faible affinité et les récepteurs nucléaires orphelins, pour lesquels aucun ligand naturel n'a encore été identifié à ce jour (**Chawla et al., 2001**).

Les formes et les actions des récepteurs sont étudiées, depuis quelques années, par cristallographie aux rayons X et par modélisation informatique. Ceci permet une meilleure compréhension des effets des médicaments sur les sites de liaison de ces récepteurs.

V.1. RECEPTEUR NUCLEAIRE DE LA VITAMINE D

L'activité biologique de la vitamine D₃ est médiée par son récepteur nucléaire (VDR (Vitamin D Receptor)) récepteur qui lui est spécifique (**Ogunkolade et al., 2002 ; Larriba et al., 2013**).

V.1.1. Identification et structure du Récepteur de la vitamine D

Les premières descriptions du VDR ont été rapportées dans les années 1968 (**Hausler et al., 1968**). Le VDR est un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires qui est hautement conservé chez les vertébrés et qui montre une homologie avec des récepteurs qui se lient aux acides biliaires tels que le récepteur F de la farnesoïde (FXR) et le récepteur du foie X (LXR) (**Hewison, 2011**). Le VDR comme tous les membres de la famille des récepteurs nucléaires a une structure avec deux domaines fonctionnels principaux : un domaine N-terminal de liaison à l'ADN (C) et un domaine C-terminal de liaison à son ligand (E) encore appelé LBD (ligand binding domain) (**Hausler et al., 2008**). Le domaine se liant à l'ADN présente deux boucles-zinc ou « Zinc-fingers » essentielles pour son interaction avec l'ADN (**Hewison, 2011**). Après la liaison de son ligand naturel, le VDR occupé forme un hétérodimère avec le récepteur rétinoïde X (RXR) et subit des changements conformationnels qui lui permettent d'interagir avec diverses protéines et enzymes accessoires nécessaires pour la chromatine, le remodelage et l'activité transcriptionnelle (**Handel et al., 2013 ; Teske et al., 2014 ; Hossein-Nezhad et al., 2014**).

Le VDR est exprimé par les organes cibles classiques de la vitamine D₃, l'intestin, l'os, le rein et les glandes parathyroïdes ainsi que dans plus de trente (30) tissus non impliqués dans l'homéostasie du calcium (kératinocytes, fibroblastes, cellules de Langerhans, cellules endothéliales, cellules du système immunitaire, cellules musculaires, cellules pancréatiques, cellules des systèmes hématopoïétiques et nerveux) (**Nieto et al., 2004 ; Gichuhi et al., 2014**).

Le gène codant pour le récepteur nucléaire humain de la vitamine D est situé sur le chromosome 12, en position 12q13.11. Il mesure 75Kb et code pour une protéine de 50 à 70 KDa. Il est constitué de quatorze exons dont six exons non traduits, non codants (exons 1A-1F), et de plusieurs régions promotrices (**Chandel et al., 2015**). Il est aussi composé d'une région 5' non transcrite (5'UTR) du promoteur du gène, d'une région de codage et de la région 3' non transcrite (3'UTR) (**Ručević et al., 2009**). La région 5' non transcrite du VDR est codée par l'exon 1 composé lui-même de trois (3) séquences formant les exons 1A, 1B, 1C impliqués dans la synthèse de quatre (4) transcrits différents du VDR (**Miyamoto et al., 1997**).

Les motifs en doigt de zinc du domaine de liaison sont codés par les exons 2 et 3. La zone Hinge est codée par les exons 4 et 5 et la région LBD par les exons 7 à 9. Le transcrit de l'ARNm du VDR est composé de 4628 bases et code pour un polypeptide de 427 acides aminés avec une masse moléculaire de 48 KDa (**Miyamoto et al., 1997 ; Ručević et al., 2009**) (**Figure 13**).

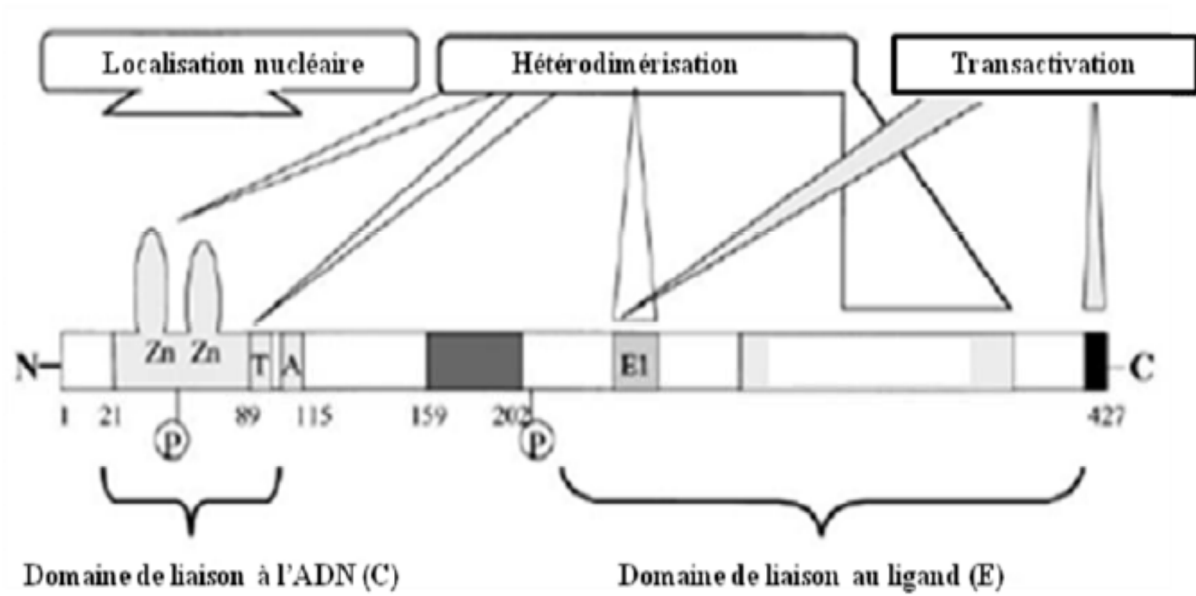


Figure 13 : Domaines fonctionnels du Récepteur de la vitamine D (VDR) (Brown *et al.*, 1999)

V.1.2. Mode d'action et rôle biologique du Récepteur de la vitamine D

L'analyse de l'expression de l'ADN complémentaire du VDR a permis d'étudier sa structure et sa fonction, mais aussi de comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans les voies de signalisation cellulaire déclenchées par la liaison de son ligand (**Pike *et al.*, 2012**). Trois étapes principales conduisent à la régulation de la transcription des gènes sous le contrôle du complexe VDR/vitamine D₃ :

➤ **Fixation du ligand**

La forme active de la vitamine D₃ (1,25 (OH)₂ D₃) est soit dégradée par la 24-hydroxylase mitochondriale (CYP24A), soit liée à son récepteur cytosolique VDR. Le domaine de liaison du ligand (LBD), situé dans la partie carboxy-terminale du VDR, est responsable de la forte affinité de liaison pour la 1,25 (OH)₂ D₃. Cette région du VDR a une fonction d'activation ligand- dépendante, appelée AF2 (**Masuyama *et al.*, 1997**). La 25 (OH) D₃ et la 24,25 (OH)₂ D₃ se lient au VDR avec une affinité 100 fois plus faible que la 1,25 (OH)₂ D₃. Après la fixation du ligand, le VDR cytoplasmique est transféré rapidement vers le noyau le long des microtubules (**Haussler *et al.*, 2011**).

➤ **Hétérodimérisation avec le RXR**

Le complexe 1,25 (OH)₂ D₃-VDR s'hétérodimérise avec le récepteur de l'acide rétinoïque (RXR). Les surfaces de dimérisation de RXR dans le VDR sont situées dans le premier motif en doigt de zinc, dans la région COOH-terminale du deuxième motif en doigt de zinc et dans le motif structural correspondant à une séquence répétée en tandem de sept acides aminés situé dans le LBD. L'asparagine (Asn 37) situé dans le premier motif en doigt de zinc, la lysine (Lys 91) et la glutamine (Glu 92) situées dans la T-box du deuxième motif en doigt de zinc, et deux des acides aminés de la séquence tandem du domaine LBD sont essentiels à l'association sélective entre le VDR et son partenaire protéique, RXR. L'hétérodimérisation du VDR activé avec le RXR induit une modification de conformation du VDR, essentielle pour sa fonction de transactivation (**Haussler *et al.*, 2011**).

➤ **Liaison de l'hétérodimère VDR-RXR au VDRE**

L'hétérodimère VDR/RXR se lie aux séquences VDRE spécifiques dans les régions promotrices des gènes cibles. L'hétérodimère lié à l'ADN attire les composants du complexe de pré-initiation de la transcription ou ARN polymérase II (Pol II) et les co-activateurs nucléaires transcriptionnels, régulant ainsi la transcription des gènes dont l'expression sera activée ou inhibée (**Haussler *et al.*, 2011**).

V.1.3. Régulation de l'activité du Récepteur de la vitamine D

L'activité du VDR peut être régulée au niveau des différentes étapes de son métabolisme à savoir l'accessibilité du ligand au VDR, le contenu cellulaire en VDR, les modifications post-translacionnelles du récepteur et la disponibilité des co-activateurs nucléaires (**Haussler et al., 2008**). Les concentrations de VDR dans une cellule cible sont régulées par les concentrations de $1,25 \text{ (OH)}_2 \text{ D}_3$ et de ses métabolites (régulation homologue), mais aussi par d'autres hormones ou facteurs de croissance qui ne se lient pas au VDR (up-régulation hétérologue) (**Pols et al., 1988**). Ces deux modes de régulation sont impliqués dans le contrôle de la transcription du gène codant pour le VDR, dans la stabilisation de son ARNm et dans l'altération de sa vitesse de dégradation qui dépend des tissus et des cellules qui lui sont spécifiques (**Zineb et al., 1998**). Ainsi, la $1,25 \text{ (OH)}_2 \text{ D}_3$ stimule l'ARNm du VDR dans les glandes parathyroïdes et le rein, mais pas dans l'intestin (**Brown et al., 1995**). Enfin, les facteurs qui interviennent dans le catabolisme du VDR régulent également celui-ci. Une régulation directe du VDR par SUG1 (composant du protéasome, intervenant dans l'ubiquitination et la protéolyse du VDR) a été mise en évidence. Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome a permis de ralentir la dégradation du VDR par cette voie (**Masuyama et MacDonald, 1998**).

V.1.4. Récepteur de la vitamine D et système immunitaire

La $1,25 \text{ (OH)}_2 \text{ D}_3$ agit sur les cellules immunitaires d'une manière autocrine ou paracrine en se liant au récepteur de la vitamine D (VDR). Les récepteurs rétinoïdes X (RXRs) peuvent former RXR-VDR (récepteur pour les complexes $1,25 \text{ (OH)}_2 \text{ D}_3$), ce qui entraîne des résultats fonctionnels élément de réponse (VDRE). La 24-hydroxylase (CYP24A1) catabolise la $1,25 \text{ (OH)}_2 \text{ D}_3$ en un métabolite inactif, l'acide calcitroïque, qui est excrété dans la bile (**Pedersen et al. 2011**).

V.2. POLYMORPHISMES DES SEQUENCES DU RECEPTEUR DE LA VITAMINE D

➤ Définition

Lorsque dans une population il y a des variations entre les individus dans la séquence des bases azotées de l'ADN d'un gène donné, on parle de polymorphismes ou de variations génétiques. On dira que ce gène a plusieurs allèles. Ces variations génétiques ou ces différents allèles, proviennent de mutations antérieures et des adaptations qui ont pu en découler. Les variations génétiques qui surviennent sur une seule paire de base d'un gène représentent 90 % de l'ensemble des variations génétiques humaines. On les appelle 'Single Nucleotide

Polymorphisms' (SNP). Les SNP peuvent se retrouver au sein de régions codantes des gènes (exons) qui seront traduites en séquence d'acides aminés, ou dans des régions non codantes (introns) qui ne le seront pas. Ils peuvent aussi se retrouver dans deux petites parties flanquant les extrémités du gène qui, bien que non codantes, sont également importantes pour l'initiation (région promotrice de l'extrémité 5'UTR) et le contrôle (3'UTR) de la transcription du gène (**Diorio et al., 2005 ; Brisson et al., 2007**). Ces SNP sont donc susceptibles d'affecter directement ou indirectement la production des protéines. Ainsi, lorsque des variations génétiques prévalent, un gène donné peut avoir diverses formes appelées allèles (**Miyamoto et al., 1997**).

Il existe de nombreuses variations dans la séquence d'ADN du gène codant le VDR. Elles sont qualifiées de polymorphismes parce qu'elles s'observent chez au moins 1 % de la population. Elles touchent l'ensemble du gène, et dépendent particulièrement des origines et de l'ethnie (**Uitterlinden et al., 2004a**).

➤ **Polymorphismes étudiés du VDR**

L'analyse des séquences d'ADN révèle des polymorphismes génétiques qui expliquent en partie, les différences d'un individu à l'autre. Ainsi, plus de 470 polymorphismes ont été décrits (**Ashktorab et al., 2011**). Les polymorphismes du VDR, les plus fréquemment analysés, correspondent aux sites de clivage d'endonucléases *Fok-1*, *Bsm-1*, *Apa-1* et *Taq-1* (**Uitterlinden et al., 2004a ; Mohapatra et al., 2013**) (**Figure 14**). Leur signification fonctionnelle et les effets potentiels sur la susceptibilité aux maladies ont été largement étudiés (**Miyamoto et al., 1997**).

Le polymorphisme Fok-1 est localisé au niveau de l'exon 2 et consiste en une transition T>C. Il modifie fondamentalement un codon ATG (Met) en un codon ACG (Thr) situé à dix paires de bases en amont du codon d'initiation de traduction, ce qui entraîne la formation d'un codon d'initiation supplémentaire (**Khan et al., 2014**). Il s'agit d'une substitution d'un nucléotide T (Thymine) en C (Cytosine) au niveau des deux sites potentiels d'initiation de la traduction. Il en résulte une protéine VDR plus courte de trois acides aminés. Ce polymorphisme a un rôle fonctionnel majeur dans l'activation transcriptionnelle du gène du VDR (**Uitterlinden et al., 2004a**).

- Le polymorphisme Bsm-1 est localisé au niveau de l'intron 8 et consiste en une transition A>G. Il s'agit d'une substitution d'un nucléotide A (Adénine) en G (Guanine) (**Mackawy et Badawi, 2014**).

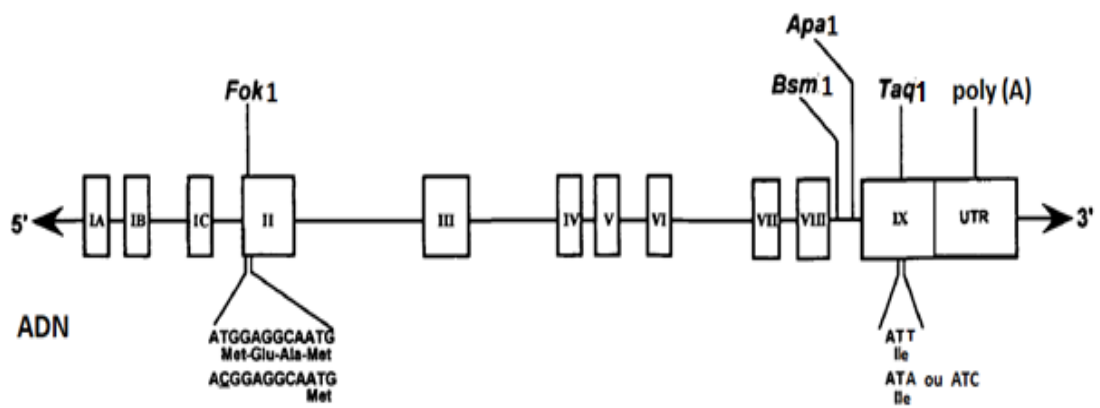


Figure 14 : Sites des polymorphismes principaux du gène codant pour le VDR (Zmuda *et al.*, 2000)

- Le polymorphisme Apa-1 est localisé au niveau de l'intron 8 et consiste en une transversion A>C. Il s'agit d'une substitution d'un nucléotide A (Adénine) en C (Cytosine) (**Faraco et al., 1989**).

Bien que Bsm-1 et Apa-1 soient considérés comme des polymorphismes mononucléotidiques silencieux (SNPs) qui ne modifient donc pas la séquence des acides aminés codants comme dans Fok-1, ils peuvent influencer l'expression des gènes par la régulation de la stabilité de l'ARNm (**Khan et al., 2014**).

- Le polymorphisme Taq-1 est localisé au niveau de l'exon 9 et consiste en une transition T/C (**Salimi et al., 2015**). Ce polymorphisme Taq-1 est une substitution d'un nucléotide donnant un codon ATC au lieu de ATT initial dans l'exon 9 (**Khan et al., 2014**). Il s'agit d'une substitution d'un nucléotide T (Thymine) en C (Cytosine) conduisant à un changement synonyme (isoleucine) au niveau du codon 352 (**Salimi et al., 2015**).

Les polymorphismes Apa-1, Bsm-1 et Taq-1 pourraient influencer l'expression du VDR en altérant la stabilité de l'ARNm. Ils sont situés dans la région 3'UTR du gène VDR avec un fort déséquilibre de liaison, ce qui explique qu'ils sont parfois étudiés ensemble en analyse d'haplotypes (l'association d'allèles de polymorphismes adjacents, les uns avec les autres) (**Wall et Pritchard, 2003**).

➤ **Polymorphismes du gène VDR et vitamine D₃**

Dans des régions codantes ou non d'un gène, il peut y avoir une substitution d'une paire de bases par un nucléotide appelée Single Nucleotide Polymorphism (SNP). Différents SNP influencent le statut en vitamine D₃. Ils peuvent concerner les gènes codant pour les enzymes intervenant soit dans la synthèse ou soit dans le catabolisme de la 25 (OH) D₃ et de la 1,25 (OH)₂ D₃, et peuvent ainsi influencer les concentrations sériques de vitamine D₃ (**Köstner et al., 2009**). Des études ont montré qu'il existait une association entre la fréquence des allèles du génotype T > C de Taq-1 et A > G de Bsm-1 avec la concentration en 25 (OH) D₃ dans le sérum. Cependant, la présence de forme d'hétérozygote [à la fois pour Taq-1 (TC) et pour Bsm-1 (AG)] peut empêcher le niveau sérique de la 25 (OH) D₃ d'atteindre les valeurs normales. Les sujets présentant ce type d'hétérozygote à la fois pour Taq-1 (TC) et pour Bsm-1 (AG) peuvent supposer un niveau inférieur sérique de 25 (OH) D₃ (**Sari et al., 2013**).

Les polymorphismes Bsm-1 et Fok-1 sont associés aux concentrations de la 25 (OH) D₃ et également à l'activité du VDR. Ces polymorphismes du VDR varient en fonction des ethnies et pourraient expliquer pourquoi certaines populations sont plus à risque de déficit en vitamine

D₃ ou de pathologies dépendantes de la vitamine D₃, que d'autres (**Filus *et al.*, 2008 ; Egan *et al.*, 2010**).

En définitive, les polymorphismes génétiques du VDR constitueraient un facteur important de susceptibilité individuelle aux effets biologiques de la vitamine D₃ (**Uitterlinden *et al.*, 2004b**).

V.3. MUTATIONS AFFECTANT LES SEQUENCES DU RECEPTEUR DE LA VITAMINE D AU COURS DE L'INFECTION A VIH

Le polymorphisme du gène VDR a un lien avec la progression de la maladie chez des patients infectés par le VIH-1 (**Barber *et al.*, 2001 ; Nieto *et al.*, 2004 ; Moodley *et al.*, 2013 ; Laplana *et al.*, 2014**). Une progression de la maladie pourrait être attribuée aux homozygotes VDR-BB (mutant), comme en témoigne la prévalence plus élevée de ce génotype chez les patients atteignant le pronostic et leur progression plus rapide vers le sida et la diminution du nombre de cellules T CD4⁺. Ces résultats fournissent des preuves solides que la variation génétique au locus VDR peut affecter le taux de progression vers l'infection VIH-1. L'homozygotie pour l'allèle Bsm-1 (mutant) du locus VDR pourrait être considérée comme un facteur de risque pour une progression de la maladie (**Barber *et al.*, 2001**). En effet, dans une étude menée par **Barber *et al.*, (2001)** sur des personnes infectées par le VIH, le polymorphisme du gène du VDR de type homozygote rares (allèle Bsm-1) est plus fréquent parmi ceux dont l'infection par le VIH progresse plus vite. On remarque également, dans le groupe des personnes infectées par le VIH ayant l'homozygote commun (allèle Bsm-1) une progression de l'infection à VIH plus lente. Il est donc fort probable que certaines personnes présentant un polymorphisme particulier du VDR aient une infection à VIH progressant plus ou moins vite (**Torres *et al.*, 2010**). Les personnes qui portent le génotype de l'allèle rare de Bsm-1 du VDR ont une réponse immunosuppressive de la vitamine D₃ réduite favorisant l'activation des cellules Th1. De plus, les hommes recevant une thérapie antirétrovirale hautement active, y compris un inhibiteur de la protéase, avaient une incidence plus élevée d'ostéopénie et d'ostéoporose, ce qui montre un lien possible entre la vitamine D₃ et les actions anti-sida. Comme montré précédemment, l'homozygotie rare de l'allèle de Bsm-1 du VDR est associée à un risque accru de progression de la maladie chez les patients recevant un traitement antirétroviral. En conséquence, il est possible d'envisager une modulation des effets de médicament selon le génotype VDR d'un patient (**Barber *et al.*, 2001**).

Une étude comparée de la population africaine infectée et non infectée par le VIH a montré des différences dans le polymorphisme Apa-1 (**McNamara *et al.*, 2016**). Des rapports

ont présenté une différence fonctionnelle entre les variantes Fok-1. La protéine VDR codée par l'allèle commun interagit le plus efficacement avec la vitamine D₃. Cependant, la protéine VDR codée par l'allèle rare présente une activité transcriptionnelle plus grande que la protéine VDR de longueur normale (**Jurutka *et al.*, 2000**). L'hétérozygotie du polymorphisme Fok-1 du locus VDR pourrait être considérée comme un facteur de risque d'évolution moins favorable de la maladie VIH-1.

VI. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

Elles ont consisté à extraire de l'ADN génomique des cellules mononucléées du sang périphérique, d'estimer sa quantité et/ou de le conserver, de déterminer précisément la taille des fragments par séparation électrophorétique, d'amplifier *in vitro* le matériel génétique et enfin de procéder au séquençage de l'ADN des séquences d'intérêt du gène.

VI.1. METHODES D'EXTRACTION DE L'ADN GENOMIQUE DES CELLULES MONONUCLEES DU SANG PERIPHERIQUE

Dans la pratique, les acides désoxyribonucléiques sont souvent extraits du sang total. Ils peuvent être aussi isolés des cellules mononucléées du sang périphérique (**Ghatak *et al.*, 2013**). Les méthodes d'extraction d'ADN des cellules mononucléées du sang périphérique sont définies en trois principales classes en fonction de leur principe. Ce sont les méthodes utilisant des solvants organiques (phénol-chloroforme), les méthodes utilisant des solvants non organiques (salt-out) et les méthodes basées sur l'utilisation des kits commerciaux (**Maurya *et al.*, 2013 ; Chacon-Cortes et Griffiths, 2014**).

VI.1.1. Méthode Phénol-Chloroforme

Le procédé classique est l'extraction par le couple phénol-chloroforme. Le phénol est un excellent agent dénaturant des protéines. Il permet de séparer efficacement les protéines et les acides nucléiques. Il est ensuite éliminé par l'extraction au chloroforme (non miscible avec l'eau). La séparation des phases aqueuse et organique se fait par centrifugation. La phase aqueuse contient les acides nucléiques. Des traitements par des agents clivant les protéines (protéolyse, exemple utilisation la protéinase K) peuvent être nécessaires. L'ADN est finalement récupéré sous forme solide à la suite de précipitation par l'alcool éthylique ou par l'alcool isopropylique (**Santos *et al.*, 2010**). La méthode d'extraction organique fonctionne bien pour la récupération de l'ADN de haut poids moléculaire. Elle sert également à enlever plus de contaminants et à donner une haute pureté à l'ADN extrait. Mais, elle est plus longue, et

implique l'utilisation de produits chimiques dangereux et toxiques (cas du phénol, du chloroforme, etc.). Ceux-ci pourraient interférer dans les méthodes d'analyse génétique telles que la digestion par les enzymes de restriction, le Southern Blot, la PCR, la PCR-RFLP et le séquençage d'ADN (**Madhad et Sentheil, 2014**).

VI.1.2. Salt-out ou méthode de relargage

Cette méthode utilise les solvants non organiques. Elle est très simple à réaliser et peu coûteuse (**Madhad et Sentheil, 2014**). Cette méthode permet d'isoler l'ADN des cellules mononucléées à partir du sang total en utilisant les différentes concentrations optimales de divers sels tels que le Tris-HCl, KCl, MgCl₂ ou le NaCl utilisé comme tampon. Dans la Salt-out method, la déprotéinisation est obtenue par relargage des protéines cellulaires par une déshydratation et une précipitation avec une solution de chlorure de sodium saturée (**Maurya et al., 2013**).

VI.1.3. Kits d'extraction

De nombreux réactifs sont disponibles, prêts à l'emploi, ce qui permet de simplifier les opérations de purification. Il est possible d'extraire l'ADN à partir d'échantillons biologiques variés dont les cultures cellulaires, les tissus divers, du sang, etc. Ces méthodes d'extraction sont très rapides, adaptées aux quantités disponibles de matériel biologique et à l'amplification par PCR de fragments génomiques, mais coûteuses (**Chacon-Cortes et Griffiths, 2014**). L'ADN extrait doit impérativement être purifié dans des conditions optimales de qualité et de quantité (**Ghatak et al., 2013**).

VI.2. QUANTIFICATION ET CONSERVATION DE L'EXTRAIT D'ADN

L'estimation de la quantité d'ADN est indispensable après son extraction du matériel biologique. La méthode basée sur la spectrophotométrie reste la plus utilisée et s'effectue dans l'ultraviolet à 260 nm et également à 280 nm. Cette dernière longueur d'onde permet d'estimer la contamination éventuelle de l'extrait par des protéines (**Fan et Margaret, 2001**). La conservation de l'ADN à court terme se fait à +4° C et à long terme à -20° C ou -80° C (**Fan et Margaret, 2001**).

L'électrophorèse est une technique qui permet de séparer les molécules d'ADN en fonction de leur taille et de leur charge en utilisant un courant électrique. On peut ainsi analyser et purifier l'ADN dans un milieu gélifié (gel d'agarose, gel de polyacrylamide, etc.) (**Gregory et al., 2006**).

Dans le cas d'une séparation par électrophorèse en gel d'agarose, les migrations des fragments d'ADN dépendent plus de leur taille que de leur charge. Ainsi, plus la taille du fragment est élevée, moins la migration électrophorétique par rapport au puits d'inclusion sera importante. A l'opposé, les fragments de petite taille auront une distance de migration plus élevée. La détermination précise des tailles des fragments séparés par électrophorèse est effectuée en faisant migrer des marqueurs de poids moléculaire en parallèle avec les échantillons à analyser. La détection de l'ADN sur ce type de gel est réalisée par exposition aux rayons UV après ajout d'un agent s'intercalant entre les brins d'ADN. Il peut s'agir soit du bromure d'éthidium (BET) (effet cancérigène), soit du SYBR[®] green I (moins toxique). L'électrophorèse des fragments d'ADN sur gel d'agarose permet des séparations jusqu'à 20-25 kb (20000-25000 pb). Des fragments d'ADN de taille restreinte (inférieure à 1000 paires de bases) peuvent aussi être séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (**Gregory *et al.*, 2006**).

VI.3. AMPLIFICATION *IN VITRO* DU MATERIEL GENETIQUE

L'amplification *in vitro* du matériel génétique a été effectuée par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Il existe plusieurs variantes de PCR dont la PCR Standard (ou classique), caractérisée par l'allongement par incorporation des désoxyribonucléotides complémentaires de la séquence de la matrice auquel elle est hybridée (**Garibyan et Avashia, 2013**), la RT-PCR (rétrotranscription de l'ARN en ADN complémentaire (ADNc) par une transcriptase inverse), la PCR en temps réel (PCR classique qui mesure la quantité des amplicons tout au long de la réaction par utilisation d'agents se liant à l'ADN double brin tels que le SYBR[®] green I et les sondes fluorescentes) (**Poitras et Houde, 2002**) et la PCR-RFLP (Polymorphisme de Longueur de Fragment de Restriction), technique dans laquelle les organismes peuvent être différenciés par l'analyse de motifs dérivés du clivage de leur ADN (**Rasmussen et Craig, 1959**).

Pour ce travail, le type de PCR utilisé est la PCR standard (ou classique). C'est une technique qui est basée sur le mécanisme de la réplication de l'ADN. L'ADN bicaténaire est déroulé en ADN monocaténaire, puis dupliqué. Elle comprend des cycles répétitifs de dénaturation de l'ADN suivie d'hybridation à l'ADN (**Poitras et Houde, 2002**). En effet, cette méthode *in vitro* permet la multiplication d'une courte séquence d'ADN (jusqu'à 2 ou 3 Kb en routine) appelée séquence cible, à partir d'une infime quantité d'ADN génomique ou d'ARN connue. La séquence cible est multipliée par synthèses successives à l'aide d'amorces oligonucléotidiques, de 4 désoxynucléotides (dA, dT, dC, dG) et d'une ADN polymérase

thermostable (**Garibyan et Avashia, 2013**). Chaque cycle de PCR est constitué de 3 étapes avec trois plateaux de température différents : la dénaturation (autour de 95° C), l'hybridation des amorces (entre 50 et 60° C) et la polymérisation ou élongation (autour de 72° C). Chaque cycle dure quelques minutes. La séquence cible étant doublée à chaque cycle, le taux d'amplification (théorique) est de 2^n , si bien qu'après une trentaine de cycles de PCR, le nombre de copies de la séquence cible est plusieurs dizaines de millions de fois supérieur à n'importe quelle autre séquence du génome. Cette surreprésentation la rend facilement analysable et manipulable.

VI.4. SEQUENÇAGE DE L'ADN

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre des nucléotides sur la molécule d'ADN. C'est le niveau de résolution le plus élevé pour rechercher la présence de mutations ponctuelles dans un gène. La méthode utilisée aujourd'hui, proposée par F. Sanger en 1977 (prix Nobel de chimie en 1980) repose sur l'utilisation de nucléotides particuliers appelés didésoxynucléotides (ddA, ddT, ddC, ddG) qui bloquent la synthèse d'ADN par les ADN polymérases après leur incorporation. Ce blocage est dû à l'impossibilité qu'ont ces nucléotides de former une liaison phosphodiester avec un autre nucléotide en raison de l'absence du groupement hydroxyle sur le carbone 3'. Depuis 1977, la méthode a considérablement évolué grâce à la mise au point de séquenceurs automatiques et de marquages des nucléotides à l'aide de fluorochromes. Elle est devenue aujourd'hui une technique rapide et fiable utilisée fréquemment dans le diagnostic des maladies héréditaires. Elle reste néanmoins coûteuse et réservée à des gènes constitués d'exons en nombre limités et de petites tailles.

VI.5. OUTILS BIOINFORMATIQUES D'ANALYSE

La bio-informatique consiste en l'ensemble des méthodes et programmes pour gérer, organiser, comparer, analyser, explorer, l'information génique et génomique stockée dans les bases de données dans le but de prédire et produire de nouvelles connaissances et de développer aussi de nouveaux concepts. L'analyse bio-informatique fondamentale et principale réalisée sur les séquences d'ADN est l'alignement. Il existe différents types d'alignements. En effet, un alignement concerne au minimum une paire de séquences. Au-delà on parle d'alignement multiple. L'alignement peut aussi être qualifié de global ou local selon qu'il concerne toute la longueur des séquences ou juste des zones précises. Il s'agit en fait de comparer des séquences grâce à des algorithmes afin de quantifier et de localiser la similarité, de trouver la meilleure mise en correspondance des résidus qui conserve l'ordre des séquences (score de l'alignement) et prendre en compte des mutations ponctuelles qui se résument en trois événements majeurs :

Insertion, Délétion et Substitution. Ainsi, grâce à l'analyse bio-informatique, on pourra distinguer les SNP (Single Nucleotide Polymorphism) qui correspondent à la substitution d'un nucléotide par un autre, les délétions d'ADN répétitifs (séquences répétées en tandem ou microsatellite) et les insertions-délétions de bases. Parmi ces polymorphismes, les SNP sont les plus fréquents (90%) et sont mieux adaptés à la recherche du fait de leur stabilité. Les SNP sont majoritairement bi-alléliques. Ils permettent de différencier 3 génotypes dont l'homozygote fréquent (sauvage), l'hétérozygote (simple mutation) et l'homozygote rare (double ou triple mutations). Si les sites alléliques sont très proches physiquement ou s'ils sont situés dans une région qui combine peu, il peut y avoir déséquilibre de liaison, c'est-à-dire que des allèles situés à deux loci ne se transmettent pas de façon indépendante. Le déséquilibre de liaison est lié à un nombre d'haplotype observé dans une population inférieure au nombre théorique évalué par le PIC (Polymorphism Information Content) qui correspond au pourcentage d'homozygotes pour chaque allèle étudié (**Wang *et al.*, 1998 ; Sachidanandam *et al.*, 2001**).

MATERIEL ET METHODES

I. POPULATION D'ETUDE

I.1. CADRE D'ETUDE ET TAILLE DE L'ECHANTILLON

L'étude s'est déroulée de Novembre 2015 à Décembre 2016 au département de Biochimie Médicale et Fondamentale de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI). Cette structure abrite un centre de dépistage volontaire et de suivi des personnes vivant avec le VIH. C'est une étude descriptive transversale. La population d'étude a concerné 326 personnes dont 163 patients vivant avec le VIH et 163 personnes séronégatives constituant la population témoin.

En effet, la taille minimale représentative de la population d'étude "n" a été déterminée selon la formule de Cochran, pour une population supérieure à 10 000 (**Agunwa et al., 2015 ; Chimah et al., 2015 ; Iloh et al., 2016**). Ainsi, le nombre minimal de sujets retenu dans cette étude, pour une population de PVVIH en Côte d'Ivoire estimée à 460 000 (**ONUSIDA, 2016**), est donné par la formule suivante :

$$n = \frac{z^2 \times p (q)}{d^2} \quad \text{ou} \quad n = \frac{z^2 \times p (1- p)}{d^2}$$

n = Estimation de la taille minimale de l'échantillon dans une population considérée

z = 1,96 (déviation standard normale) Coefficient de marge déduit du taux de confiance (95 %)

p = Proportion dans la population cible estimée avoir une caractéristique particulière (prévalence estimative de la variable). Selon **ONUSIDA (2016)**, la prévalence du VIH dans la population ivoirienne est 2,7 %.

q = 1 - p (Probabilité d'échec ou probabilité de réalisation négative)

d = Précision souhaitée ou l'erreur tolérable (0,05)

$$n = \frac{1,96^2 \times 0,027 (1- 0,027)}{0,05^2} \quad n = 40,37$$

I.2. CRITERES DE SELECTION DES SUJETS

I.2.1. Critères d'inclusion des patients et des témoins

Les échantillons sanguins de personnes adultes (hommes et femmes) dont l'âge est compris entre 18 et 49 ans, ayant une sérologie VIH positive confirmée après examens de laboratoire et un bilan de base complet ont été inclus dans cette étude. Ce bilan de base

comprendait la numération des CD4+, la numération de la formule sanguine (NFS), la glycémie, la créatinine et l'alanine aminotransférase (ALAT).

De plus, ont été inclus dans cette étude les échantillons sanguins de personnes adultes (hommes et femmes) séronégatives au VIH confirmées et dont l'âge est compris entre 18 et 49 ans.

I.2.2. Critères de non inclusion des patients et des témoins

Les échantillons sanguins de personnes VIH positif sans bilan de base ou ayant un bilan de base incomplet et ceux des femmes enceintes et des enfants (moins de 15 ans) séronégatifs au VIH n'ont pas été inclus dans cette étude.

I.3. ASPECT ETHIQUE

Cette étude a été menée en accord avec la déclaration d'Helsinki 2000 concernant la recherche sur le VIH et le sida menée dans les pays pauvres et conformément à la législation locale en matière de programme national de prise en charge des personnes vivant avec VIH / sida (Décret n ° 411 du 23 décembre 2001). Cependant, pour cette étude, un consentement a été obtenu des personnes pour l'utilisation de leurs échantillons de sang prélevés lors du suivi biologique pour la recherche (**Annexe 9**).

II. MATERIEL

II.1. MATERIEL BIOLOGIQUE

Le matériel biologique est constitué d'échantillons de sang veineux prélevés chez des PVVIH et chez des témoins à jeun sur tubes secs sans anticoagulant, sur tube contenant de l'oxalate de potassium et du fluorure de sodium, et sur tube contenant de l'EDTA (Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique). Ces échantillons sont ensuite transportés dans des glacières contenant des accumulateurs de froid (ice-pack) et sont accompagnés de fiches de suivi du prélèvement.

Ainsi, le sang total prélevé sur tubes sans anticoagulant, acheminé au laboratoire, est centrifugé à 3000 trs/min pendant 5 min pour recueillir le sérum nécessaire à la réalisation des tests sérologiques VIH, biochimiques (créatinine, urée, Alanine aminotransférase, calcium, phosphore, magnésium, phosphatase alcaline et parathormone) et au dosage de la vitamine D₃. Une partie des sérums obtenus à partir des tubes sont aliquotés en doublet ou triplet à raison de 500 à 1000 µL dans des tubes eppendorf à l'abri de la lumière, puis conservés à - 20 °C pour le dosage de la 25-hydroxyvitamine D₃. Quant au sang recueilli dans les tubes contenant de

l'oxalate de potassium et du fluorure de sodium, il a été centrifugé et le sérum obtenu a été utilisé pour le dosage de la glycémie. Le sang total recueilli dans des tubes contenant de l'EDTA a servi à la réalisation de la Numération de la Formule Sanguine (NFS), au comptage des cellules CD4⁺, et à l'extraction des cellules mononucléées nécessaire pour obtenir l'ADN pour la PCR,

II.2. MATERIEL TECHNIQUE ET REACTIFS

L'équipement technique utilisé pour la réalisation de ce travail comprend, en dehors du nécessaire d'épreuve (petits matériels et consommables pour le dosage des différents paramètres biologiques et consommables de biologie moléculaire) les automates.

II.2.1. Appareillages utilisés

- En Immunologie

Le cytomètre en flux FACSCalibur (BD Becton, Dickinson, USA) (**Annexe 10**) est l'appareil qui a été utilisé pour la numération des CD4⁺.

- En Hématologie

L'analyseur hématologique (SYSMEX 1800i, Chine) a été utilisé pour la Numération de la Formule Sanguine (NFS).

- En Biochimie

Le COBAS C 311 HITACHI (Japon) (**Annexe 11**) a été utilisé pour le dosage des paramètres biochimiques (glycémie, créatinine, urée, Alanine aminotransférase, calcium, phosphore, magnésium, phosphatase alcaline). Quant au COBAS 6000 HITACHI (Japon), il a servi au dosage de la parathormone (PTH).

- En Chromatographie Liquide de Haute Performance (CLHP)

Le Chromatographe en phase Liquide de Haute Performance (HPLC en anglais) 6890N (Waters[®], France) sous le contrôle du logiciel BREEZE 2 (**Annexe 7**) a été utilisé pour le dosage de la 25-hydroxyvitamine D₃.

Le bon fonctionnement de cet appareil a nécessité l'utilisation d'éléments complémentaires suivants:

- Une colonne C18 en silice greffée ODS 2 (40 × 250) a servi de phase stationnaire ;
- Un détendeur (dispositif d'évaporation sous courant d'azote) pour l'extraction des vitamines liposolubles avant leur dosage par HPLC.

- En Biologie Moléculaire

- Le Hotte PSM III Advance[®] (poste de sécurité microbiologique III, France) a été utilisé pour la biosécurité ;

- Le Thermocycleur Applied Biosystems (2720 ThermalCyber, Singapour) a servi à la réalisation des amplifications géniques.

La Biologie Moléculaire a nécessité d'autres types d'appareils dont :

- Une microonde (modèle SHARP) a été utilisé pour la préparation du gel d'agarose ;

- Une cuve de migration (modèle MP-300V BIOCOM) a servi pour l'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments d'ADN ;

- Un UV transilluminateur (modèle MUV21-312, BIOCOM) a été utilisé pour la visualisation des bandes d'ADN ;

- Un Séquenceur (Sequencing Analysis, Gene Scan, SeqScape et Genotyper) pour le séquençage des fragments d'ADN ;

- Une Centrifugeuse réfrigérée (SIGMA BIOBLOCK SCIENTIFIC, Allemagne) ;

- Un Agitateur (MIX Fisherbrand[™], France) ;

- Des pipettes P10 μ L (0,1-10 μ L), P50 μ L (5-50 μ L), P200 μ L (20-200 μ L) et P1000 μ L (10-1000 μ L) de marque pipetteMan

- Block chauffant (@ms major science MD-MINI) pour l'incubation ;

- Des Congélateurs -80 °C et -20 °C (SAMSUNG, modèle RZ90EERS, Corée du sud).

II.2.2. Réactifs

- En Sérologie

Des bandelettes DETERMINE[®] HIV₁/HIV₂ de marque Abbott et des supports de réaction *SD Bioline HIV-1/2 3.0* (STANDARD DIAGNOSTICS, INC, Coré) et HIV 1/2 STAT-PAK[®] (CHEMBIO, USA) contenant les réactifs ont été utilisés pour la mise en évidence et la détection des anticorps anti-VIH.

- En Immunologie

Les réactifs trucount test et tritest (CD3⁺, CD4⁺, CD45⁺) de marque BD (USA) ont été nécessaires pour la numération des CD4⁺.

- En Biochimie

Des cassettes de réactifs spécifiques de marque Roche diagnostic (France) ont servi aux dosages des paramètres biochimiques (glycémie, créatinine, urée, Alanine aminotransférase, calcium, phosphore, magnésium, phosphatase alcaline) et de la parathormone.

- En Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

- Le méthanol, l'éthanol, la N-hexane de grade HPLC ont été utilisés pour l'extraction des vitamines liposolubles et leur dosage ;

- L'acétonitrile de grade analytique (Millipore, USA) qui est mélangé avec de l'eau MilliQ (v/v) a servi de phase mobile ;

- Le standard de 25-hydroxyvitamine D₃ monohydrate, C₂₇H₄₄O₂ - H₂O, ≥98 % (HPLC) (SIGMA, lot : 17938, Allemagne) a été utilisé comme étalon interne.

- En Biologie Moléculaire

- Un Tampon phosphate buffer saline (PBS) a été nécessaire pour réaliser les dilutions ;

- Un Milieu de séparation des lymphocytes, d = 1,077 (Lymphocytes separation medium de marque EUROBIO) pour l'isolement des cellules mononucléées des autres cellules du sang ;

- Un kit de purification de l'ADN (QIAGEN) (SIGMA-ALDRICH, Allemagne);

- Un kit de purification des Amplicons (Roche Diagnostics, High Pure PCR product purification kit, Mannheim, Allemagne) ;

- De la protéinase K (10 mg/mL) (SIGMA-ALDRICH, Allemagne) nécessaire à l'inhibition des protéines contenues dans l'extrait d'ADN ;

- De l'éthanol à 96°C glacial nécessaire pour précipiter l'ADN ;

- Des amorces spécifiques de chaque gène (SIGMA-ALDRICH, Allemagne) ; Customer N° : 0035442054 ;

- L'HOT FIREpol® Blend Master Mix (Biodyne Solis, Estonie) a été utilisé pour la préparation du Mix de PCR ;

- De l'agarose en poudre ULTRA Pure™ Lot : 143377 nécessaire à la préparation du gel ;

- Du tampon TBE 1X (Tris, Acide Borique et EDTA) nécessaire à la préparation du gel d'agarose et servant de solution de migration des fragments d'ADN ;

- Du SYBR green I (Sigma-Aldrich, Allemagne) pour la visualisation des fragments d'ADN ;

- Un marqueur de taille 100 bp (lot H1-1058, Hyper Ladder 1, BIOLINE).

II.3. SEQUENCES DES GENES DU VDR A AMPLIFIER ET OLIGONUCLEOTIDES

Quatre séquences nucléotidiques d'intérêt provenant du gène complet du récepteur de la vitamine D (VDR) ; Homo sapiens, NCBI Reference Sequence : NG_008731.1. ont été

amplifiées à la base du polymorphisme du gène VDR. Ce sont l'exon 2 (Fok-1) de 267 pb, l'intron 8 (Bsm-1) de 822 pb, l'intron 8 (Apa-1) de 195 pb et l'exon 9 (Taq-1) de 745 pb (**figure 15**).

❖ **Oligonucléotides utilisés pour la PCR**

Au cours de cette étude, des oligonucléotides ou amorces spécifiques (**Tableau I**) pour chaque gène à amplifier (Fok-1, Bsm-1, Apa-1, Taq-1) ont été utilisés selon leurs programmes d'amplification (**Tableau II**).

Ainsi, le couple d'amorces Fok-1 (sens et antisens) utilisé pour amplifier le gène Fok-1 (exon 2) a été synthétisé sur la base des séquences publiées par **Rizk *et al.* (2014)**, **Hamadé *et al.* (2014)** et **Rashedi *et al.* (2014)**.

L'amorce Bsm-1 (sens et antisens), dont les séquences ont été élaborées sous la base des publications de **Mishra *et al.* (2013)** et **Rashedi *et al.* (2014)** a servi à amplifier le gène Bsm-1 (intron 8).

Quant à l'amplification du gène Apa-1, le couple d'amorces Apa-1(sens et antisens) utilisé a été synthétisé selon les séquences publiées par **Chakraborty *et al.* (2009)**.

De même, les séquences de l'amorce Taq-1 (sens et antisens) nécessaires à l'amplification du gène Taq-1 (exon 9) ont été élaborées sur la base de celles publiées par **Serrano *et al.* (2014)**, **Hamadé *et al.* (2014)** et **Rashedi *et al.* (2014)** (**Tableau I**).

La PCR a permis d'amplifier fragments d'ADN d'intérêt du gène du VDR de 267 pb, 822 pb, 195 pb et 745 pb respectivement Fok-1 (exon 2), Bsm-1 (intron 8), Apa-1 (intron 8) et Taq-1 (exon 9) (**Tableau II**).

Exon 2 (Fok-1), 267 pb, rs2228570

30841	tgggtggcac	caaggatgcc	agctggcct	ggcactgact	ctggctctga	ccgtggcctg
30901	cttgctgttc	ttacagggat	ggaggcaatg	gcggccagca	cttcctgcc	tgaccctgga
30961	gactttgacc	ggaacgtgcc	ccgatctgt	gggtgtgtg	gagaccgagc	cactggcttt
31021	cacttcaatg	ctatgacctg	tgaaggctgc	aaaggcttct	tcaggtgagc	cctcctcca
31081	ggctctccc	agtggaaagg	gagggagaag	aagcaagggtg	ttccatgaa	gggagcctt

Intron8 (Bsm-1), 822 pb, rs1544410

63301	ccttcaccat	ggacgacatg	tctggacct	gtggcaacca	agactacaag	taccgcgtca
63361	gtgacgtgac	caaaggtatg	cctagactcc	acctcctggg	gagtctttt	cagctcccag
63421	attctggctc	caccgctcct	ggggtttggc	tccaatcaga	tacatgggag	ggagttaggc
63481	accaacaggg	agagaagggc	gagggtcaga	cccatgggtg	tggaggtggg	tgggcggctc
63541	ctcagctctg	cccgcagtac	ctggccattg	tctctcacag	ccggacacag	cctggagctg
63601	attgagcccc	tcatcaagtt	ccaggtggga	ctgaagaagc	tgaacttgca	tgaggaggag
63661	catgtcctgc	tcatggccat	ctgcatcgtc	tccccaggta	tggggccagg	cagggaggag
63721	ctcagggacc	tggggagcgg	ggagtatgaa	ggacaaagac	ctgctgaggg	ccagctgggc
63781	aacctgaagg	gagacgtagc	aaaaggagac	acagataagg	aaatacctac	tttgtcgttt
63841	tgcagagccc	ctgtggtgtg	tggacgctga	ggtgccctc	actgccctta	gctctgcctt
63901	gcagagtgtg	cagggcattc	gtagggggga	ttctgaggaa	ctagataagc	agggttctctg
63961	gggccacaga	cagggcctgcg	cattccaat	actcaggctc	tgctcttgcg	tgaactgggc
64021	tcaacattcc	tgttatttga	ggtttcttgc	gggcagggtg	caaaactttg	gagcctgaga
64081	gatggttctg	cctatatagt	ttacctgatt	gattttggag	gcaatgtgca	gtgacccttg
64141	acctcttccg	ctggtttagag	gtgagaagag	ggagaaaagg	ccgaagagga	agttatttgtg

Intron 8 (Apa-1), 195 pb, rs7975232

64921	ggggtgctgc	cgttgagtgt	ctgtgtgggt	ggggggtggt	gggattgagc	agtgaggggc
64981	ccagctgaga	gctcctgtgc	cttcttctct	atccccgtgc	ccacagatcg	tcttgggggtg
65041	caggacgccg	cgctgattga	ggccatccag	gaccgctgt	ccaacacact	gcagacgtac
65101	atccgctgcc	gccaccgcc	cccgggcagc	cacctgctct	atgccaagat	gatccagaag

Exon 9 (Taq-1), 745 pb, rs731236

64741	cgcacggga	cgctgagggg	tggacagagc	atggacaggg	agcaaggcca	ggcagggaca
64801	gggccagggtg	cgcccatgga	aggacctagg	tctggatcct	aatgacagc	agaagtcact
64861	ggagggcttt	ggggccaggc	agtggatca	ccggtcagca	gtcatagagg	ggtggcctag
64921	ggggtgctgc	cgttgagtgt	ctgtgtgggt	ggggggtggt	gggattgagc	agtgaggggc
64981	ccagctgaga	gctcctgtgc	cttcttctct	atccccgtgc	ccacagatcg	tcttgggggtg
65041	caggacgccg	cgctgattga	ggccatccag	gaccgctgt	ccaacacact	gcagacgtac
65101	atccgctgcc	gccaccgcc	cccgggcagc	cacctgctct	atgccaagat	gatccagaag
65161	ctagccgacc	tgcgcagcct	caatgaggag	cactccaagc	agtaccgctg	cctctccttc
65221	cagcctgagt	gcagcatgaa	gctaaccgcc	cttgtgctcg	aagtgtttgg	caatgagatc
65281	tcctgactag	gacagcctgt	ggcgggtgct	gggtggggct	gctcctccag	ggccacgtgc
65341	caggcccggg	gctggcggct	actcagcagc	cctcctcacc	ccgtctgggg	ttcagccctt
65401	cctctgccac	ctcccctatc	caccagccc	attctctctc	ctgtccaacc	taacccttt
65461	cctgcgggct	tttcccgggt	cccttgagac	ctcagccatg	aggagttgct	gtttgtttga

Figure 15 : Séquences nucléotidiques d'intérêt provenant du gène complet du récepteur de la vitamine D (VDR) Humain, NCBI Reference Sequence NG_008731.1

Tableau I : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour amplifier les différents fragments d'ADN du VDR

Amorces utilisées	Séquences nucléotidiques des amorces	Séquences étudiées du VDR
Fok-1F Lot : HA09198693	5'- AGC-TGG-CCC-TGG-CAC-TGA-CTC-TGG-CTC - 3'	Fok-1 (exon2)
Fok-1R Lot : HA09198694	5'- ATG-GAA-ACA-CCT-TGC-TTC-TTC-TCC-CTC - 3'	
Bsm-1F Lot : HA09198695	5'- CAA-CCA-AGA-CTA-CAA-GTA-CCG-CGT-CAG-TGA - 3'	Bsm-1 (intron8)
Bsm-1R Lot : HA09198696	5'- AAC-CAG-CGG-AAG-AGG-TCA-AGG-GT - 3'	
Apa-1F Lot : HA09198697	5'- GGT-GGG-ATT-GAG-CAG-TGA - 3'	Apa-1 (intron8)
Apa-1R Lot : HA09198698	5'- ATC-TTG-GCA -TAG-AGC- AG - 3'	
Taq-1F Lot : HA09198699	5'- CAG-GCA-GGG-ACA-GGG-CCA-GGT- 5'	Taq-1 (exon9)
Taq-1R Lot : HA09198700	5'- GCA-GGA-AAG-GGG-TTA-GGT-TGG-ACA - 3'	

F : Amorce sens ; R : Amorce antisens

Tableau II : Conditions d'amplification des fragments d'intérêt d'ADN du VDR

SNP étudiés du gène du VDR Humain	Taille (pb)	Nom du Programme	Conditions d'amplification
Exon 2 Fok-1(rs2228570)	267	AKBD-Fok-1Bsm-1	1- 94°C x 5 min >>>>> dénaturation initiale 2- 94°C x 30 sec >>>>> dénaturation 3- 51°C x 30 sec >>>>> hybridation 4- 72°C x 1 min >>>>> extension 5- 34 fois à partir de l'étape 4 6- 72°C x 7 min >>>>> extension finale 7- 4°C indéfini
Intron 8 Bsm-1(rs1544410)	822		
Intron 8 Apa-1(rs7975232)	195	AKBD-Apa-1	1- 94°C x 5 min >>>>> dénaturation initiale 2- 94°C x 30 sec >>>>> dénaturation 3- 53°C x 30 sec >>>>> hybridation 4- 72°C x 1 min >>>>> extension 5- 34 fois à partir de l'étape 4 6- 72°C x 7 min >>>>> extension finale 7- 4°C indéfini
Exon 9 Taq-1 (rs731236)	745	AKBD-Taq-1	1- 94°C x 5 min >>>>> dénaturation initiale 2- 94°C x 30 sec >>>>> dénaturation 3- 69°C x 30 sec >>>>> hybridation 4- 72°C x 1 min >>>>> extension 5- 34 fois à partir de l'étape 4 6- 72°C x 7 min >>>>> extension finale 7- 4°C indéfini

*SNP = Single Nucleotide Polymorphisms

III. METHODES

III.1. DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DU VIH

En Côte d'Ivoire, l'algorithme adopté au poste de dépistage (**Annexe 12**), recommande l'utilisation de deux tests rapides en série. Le test est réalisé par piqure au bout du doigt en intégrant le conseil pré-test et post-test par le même prestataire. Le deuxième test est un test de confirmation qui est utilisé en cas de réaction positive du premier test. Cet algorithme permet d'obtenir les résultats suivants : VIH négatif, VIH positif et statut VIH indéterminé.

En cas de statut VIH indéterminé, le prestataire doit référer le client ou son prélèvement au niveau du laboratoire de référence.

➤ Au laboratoire

Le troisième test est réalisé en cas de résultat discordant entre le premier test et le second test. C'est un test décisionnel qui permet d'avoir le résultat définitif. Ainsi, au laboratoire, les tests rapides DETERMINE (**Figure 16a**) et SD-Bioline VIH-1/2 (**Figure 16b**) sont utilisés. En cas de discordance entre le DETERMINE et le BIOLINE, le test STAT PAK (**Figure 16c**) est utilisé.

III.1.1. Détection des anticorps anti - VIH par le test rapide de type DETERMINE

Le test rapide DETERMINE est un test immunochromatographique pour la détection qualitative des anticorps anti-VIH-1 et anti-VIH-2.

Le principe est basé sur la formation d'un complexe Antigène-Anticorps révélé par la coloration (**Gürtler et al., 1994**). L'échantillon est déposé sur la zone de dépôt de l'échantillon et migre jusqu'à la zone de dépôt du conjugué. A ce niveau, il se reconstitue et se mélange avec le conjugué colloïde de sélénium-antigène. Ce mélange continue à migrer sur la phase solide jusqu'aux antigènes recombinants immobilisés et aux peptides synthétiques au niveau de la fenêtre-patient.

Dans la réalisation du test, après avoir retiré la protection plastique de chaque test en suivant les flèches indicatives, un volume de 50 µL de sérums test est déposé délicatement sur la zone de dépôt spécifique de l'échantillon. Puis, au bout de 15 min de migration, la lecture est effectuée et le résultat déterminé au niveau de la fenêtre patient. Une barre de contrôle de la procédure est incluse dans le dispositif afin d'assurer la validité du test qui doit nécessairement virer au rouge. Dans cette expérimentation, en dehors du contrôle de la procédure, un sérum contrôle négatif et un sérum contrôle positif "maison" sont également testés.

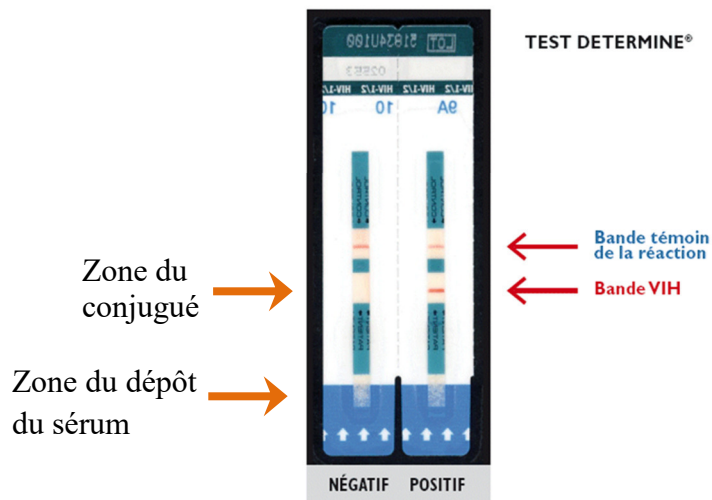


Figure 16a: Test rapide de type DETERMINE® (WHO, 2005)

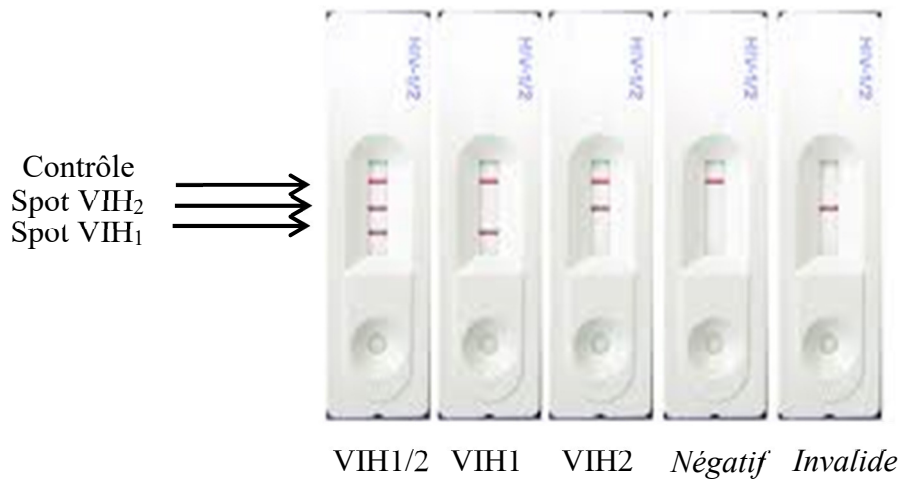


Figure 16b: Test rapide de type SD-Bioline VIH-1/2 (Photographie Aké Aya Jeanne A., 2015)

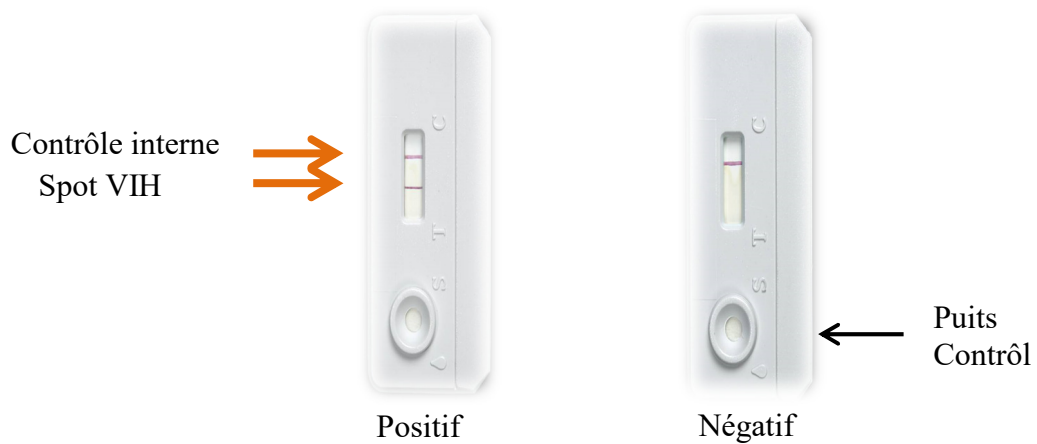


Figure 16c : Test rapide de type STAT-PAK (Photographie Aké Aya Jeanne A., 2015)

Figure 16 : Tests rapides utilisés pour la détection des anticorps anti-VIH

- Le test est dit positif lorsqu'il apparait deux barres rouges, une dans la fenêtre contrôle et une autre dans la fenêtre "patient".
- Le test est dit négatif lorsqu'il apparait une seule barre rouge dans la fenêtre contrôle et pas de barre rouge dans la fenêtre "patient".

Pour assurer la qualité et la fiabilité des résultats, un deuxième lecteur a procédé également à sa validation. En cas de lecture discordante, l'analyse est reprise. Avec le test DETERMINE[®], il est possible d'obtenir des faux négatifs dus à plusieurs facteurs, comme par exemple, un faible taux d'anticorps en-dessous de la limite de détection du test (par exemple en début de séroconversion), ou une infection par un variant du virus moins facilement détectable par la configuration du test DETERMINE[®]. Dans ce cas, les échantillons sont soumis à un autre test de diagnostic. Les échantillons positifs doivent être réanalysés en utilisant une autre méthode. Par conséquent, tous les sérums analysés grâce au test DETERMINE[®] ont été soumis à un test immunoenzymatique rapide (SD-Bioline VIH-1/2) pour la détection spécifique des anticorps anti-VIH-1 (100 %) et anti-VIH-2 (100 %) avec une spécificité > 99 % (**Amadou *et al.*, 2005 ; Ouassa *et al.*, 2007 ; Owen et O'Farrell, 2007**).

III.1.2. Détection des anticorps anti-VIH par le test rapide de type SD-Bioline VIH-1/2

Le test SD-Bioline VIH-1/2 est un test immunoenzymatique de double reconnaissance permettant le typage du VIH par des anticorps anti-VIH-1 et VIH-2 dirigés spécifiquement contre les antigènes (**Sagar *et al.*, 2015**).

La cassette contient une membrane absorbante sur laquelle sont inscrites trois zones. Une zone de l'antigène recombinant HIV-1 (GP41, Protéine 41) constituant la bande 1, une zone de l'antigène recombinant HIV-2 (GP36) constituant la bande 2 et une zone de control. Une fois l'échantillon déposé, les anticorps du VIH (présent) sont couplés à l'or colloïdal de la membrane et migrent le long de cette dernière vers la fenêtre de lecture (**Figure 16b**). Le complexe antigène-anticorps-or (hautement sensible) se manifeste par une ligne visible (bande rouge). Une bande de contrôle assure la validité du test.

Dans la réalisation du test, après avoir sorti le nombre nécessaire de supports de réaction, les réactifs et les échantillons sont amenés à la température ambiante avant leur utilisation. La protection de la plaque SD-Bioline VIH-1/2 est enlevée. Un volume de 20 µL de sang total ou 10 µL de sérum ou plasma est transféré dans le puits. Puis, trois à 4 gouttes (150 µL) de diluant sont ajoutés. La lecture du résultat est effectuée dans les 5 à 20 minutes qui suivent l'ajout du diluant.

Le test est dit VIH1 positif lorsqu'il apparait deux barres rouges, une dans la fenêtre contrôle et une autre dans la fenêtre patient VIH1 (spot VIH1). Le test est dit VIH2 positif lorsqu'il apparait deux barres rouges, une dans la fenêtre contrôle et une autre dans la fenêtre patient VIH2 (spot VIH2). Le test est dit VIH1/2 positif lorsqu'il apparait trois barres rouges : une dans la fenêtre contrôle, une dans la fenêtre patient VIH1 et une autre dans la fenêtre patient VIH2 (spot VIH1 et spot VIH2). Le test est dit négatif lorsqu'il apparait une seule barre rouge dans la fenêtre contrôle et pas de barre rouge dans la fenêtre "patient".

III.1.3. Détection des anticorps anti - VIH par le test rapide de type STAT-PAK

Le test rapide STAT-PAK est un test immunochromatographique permettant la détection qualitative des anticorps anti-VIH-1 et anti-VIH-2. Le principe est basé sur la formation d'un complexe Antigène-Anticorps révélé par la coloration.

Dans la réalisation du test, après avoir retiré la protection de chaque test et identifié la cassette du test par un code, 5 µL de sang total (une goutte) sont déposés au centre du puits. Puis, 3 gouttes de tampon sont ajoutées dans le même puits, Au bout de 10 min de migration, la lecture est faite au niveau de la fenêtre patient. Une barre de contrôle de la procédure est incluse dans le dispositif afin d'assurer la validité du test qui doit nécessairement virer au rouge. Le test STAT-PAK est positif lorsque les barres "contrôle" et "patient" virent au rouge. Le test STAT-PAK est négatif lorsque seule la barre de contrôle vire au rouge.

III.2. NUMERATION DES LYMPHOCYTES T CD4+

La numération des lymphocytes T CD4+ a été réalisée par la technique de cytométrie en flux (FacsCalibur, USA) (**Annexe 10**). Elle est basée sur l'analyse rapide des particules (cellules) en mouvement qui défilent une à une, à l'intérieur d'une gaine liquide, devant un faisceau lumineux à rayon laser (**Ormerod et Imrie, 1990 ; Ormerod et al., 1993**).

Dans la pratique, un volume de 50 µL de sang total de chaque échantillon d'étude a été ajouté à un volume de 20 µL de tritest (CD3, CD4, CD45) contenus dans chaque tube trucount préalablement identifiés par des codes. Après ajout d'un volume de 500 µL d'une solution de lyse diluée (1/10), les tubes sont homogénéisés et incubés pendant 15 min à l'obscurité. Cette opération (homogénéisation et l'incubation des tubes dans l'obscurité) est répétée une seconde fois, puis les tubes trucount sont placés sur la grille du dispositif FacsCalibur après une troisième homogénéisation. Le mélange est aspiré dans le compteur cytométrique en flux. Ensuite, le bouton « ENREGISTRER » est appuyé et les résultats sont exprimés, sur l'écran, en

pourcentage et en valeur absolue pour chaque patient. Par ailleurs, les résultats sont automatiquement enregistrés dans l'ordinateur dans un dossier approprié (fichier du jour).

Les valeurs de référence normales pour le taux de lymphocytes T CD4+ selon l'OMS sont 600-1750 cellules/mm³ (31-60 %). Tous les patients infectés par le VIH sont répartis en quatre groupes selon le nombre de lymphocytes T CD4+ : immunodéficience non significative (≥ 500 cellules/mm³), immunodéficience moyenne (499-350 cellules/mm³), immunodéficience avancée (349-200 cellules/mm³) et immunodéficience sévère (< 200 cellules/mm³) (**WHO, 2008 ; Boyvin *et al.*, 2013 ; Ademasu *et al.*, 2014**) (**Annexe 13**).

III.3. DOSAGE DES PARAMETRES BIOCHIMIQUES

Le dosage de la créatinine, de l'urée, de l'Alanine aminotransférase (ALAT), de l'Aspartate aminotransférase (ASAT), du calcium, du phosphore, du magnésium, de la phosphatase alcaline a été réalisé sur le spectrophotomètre COBAS C311 HITACHI. Le principe est basé sur une méthode enzymatique et colorimétrique utilisant un chromogène. L'intensité de la coloration développée est directement proportionnelle à la concentration de la substance dosée (**Deyhimi *et al.*, 2006**).

En effet, en pratique, l'automate (COBAS) est au préalable mis en marche ainsi que le système d'eau. Par la suite, la maintenance quotidienne est réalisée.

Une fois les positions de cassette "Contrôle", de cassettes " Calibrateur" et de cassettes "Réactifs" confirmées, les différentes cassettes sont installées dans leurs compartiments respectifs. Le sérum de contrôle (Precicontrol clinchem multi1) est dosé et les calibrations sont faites. Lorsque la valeur de contrôle s'avère exacte, les échantillons des patients peuvent être dosés. La fiche qui apparaît à l'écran de travail est remplie en y indiquant le code identifiant, le nom et le prénom du patient. Les paramètres à doser sont sauvegardés et validés en appuyant sur la touche "START".

Les résultats affichés à l'écran sont imprimés et enregistrés dans le cahier de paillasse, puis sur fichier informatique dans le dossier Résultat. Ces résultats sont interprétés selon les valeurs de référence des marqueurs biochimiques (calcium, phosphore, glycémie, créatinine, urée, magnésium, phosphatase alcaline) (**Tableau III**).

III.4. DOSAGE DE LA PARATHORMONE

Le COBAS 6000 (HITACHI, Japon) a été utilisé pour le dosage de la parathormone. En effet, le principe du dosage de la parathormone est immunologique par électrochimiluminescence (ECL). Il s'agit d'un dosage en technique sandwich qui se fait en une étape,

Tableau III : Valeurs normales de référence des marqueurs biochimiques recherchés
(Yapo *et al.*, 1990)

Paramètres biochimiques	Valeurs de références	Valeurs de références en UI (unité internationale)
Créatinine	5 - 12 mg/L	53,1 - 123 µmol/L
Urée	0,10-0,35 g/L	2,49 - 7,47 mmol/L
Glycémie	0,75 - 1,10 g/L	3,89 - 5,83 mmol/L
Phosphatase alcaline	40-129 UI/L	40-129 UI/L
Alanine aminotransférase	7 - 48 UI/L	7 - 48 UI/L
Calcium	90 – 110 mg/L	2,20 - 2,55 mmol/L
Phosphore	28 – 45 mg/L	0,8 - 1,6 mmol/L
Magnésium	16-23 mg/L	0,65 - 1,15 mmol/L

conduisant à la formation de complexe réactionnel. La détection du complexe réactionnel est réalisée suite à l'application d'une tension électrique. Ainsi, la lumière générée est quantifiée.

Ainsi, après avoir mis l'automate en marche et la maintenance quotidienne réalisée, le chargement des réactifs est effectué ainsi que leurs calibrations et leurs contrôles. Ensuite, l'enregistrement des échantillons est réalisé en allant sur « Routine » affiché à l'écran de l'ordinateur du COBAS 6000. La fiche qui apparaît à l'écran de travail est remplie en y indiquant le code identifiant, le nom et le prénom du patient. Ensuite, il faut appuyer sur « enter », puis sélectionner le paramètre à doser et cliquer sur « Attribution manuelle ». Le numéro du rack et la position sur le rack sont validés. Une fois les échantillons installés, il faut valider en cliquant sur « START ».

Les résultats affichés à l'écran sont imprimés, puis enregistrés dans le cahier de paillasse, et sur fichier informatique dans le dossier Résultat. Ils sont ensuite interprétés selon les valeurs de référence de la parathormone situées entre 10 et 65 pg/mL (**Havens *et al.*, 2012**).

III.5. DOSAGE DE LA VITAMINE D₃

Le dosage de la 25-hydroxyvitamine D₃ a été réalisé par détection UV en chromatographie liquide à haute performance (CLHP). Il se fait en mode isocratique avec un appareil de type Waters® (**Catignani et Bieri, 1983**).

III.5.1. Extraction des lipides sériques contenant la vitamine D₃

L'extraction des lipides est réalisée à l'abri de la lumière. Après la décongélation des échantillons à température ambiante, un volume de 300 µL de sérum est prélevé et recueilli dans des tubes à hémolyse préalablement enveloppés de papier Aluminium, dans lesquels sont introduits 300 µL de rétinyl acétate (1mg/L) (**Catignani et Bieri, 1983 ; Zaman *et al.*, 1993**). Après l'addition de 300 µL d'éthanol absolu, le mélange (sérum-étalon interne et éthanol absolu) est homogénéisé au vortex pendant 20 sec, puis 1 200 µL d'hexane y sont ajoutés. L'ensemble est à nouveau soumis au vortex deux fois de suite pendant 30 sec, puis centrifugé à 3 500 tours/min pendant 15 min. Neuf cent microlitres (900 µL) de surnageant hexanique contenant les vitamines liposolubles sont prélevés et mis dans des tubes à hémolyse pour être évaporés sous un courant d'azote (0,5 bar). Après évaporation, un volume de 300 µL de méthanol est ajouté au résidu, puis la solution obtenue est légèrement agitée et injectée dans le chromatographe (CLHP).

III.5.2. Dosage de la 25-hydroxyvitamine D₃

Un volume de 20 µL de l'échantillon est injecté à partir de la boucle d'injection du HPLC pour l'étude de la vitamine (Aké *et al.*, 2001).

➤ *Conditions d'analyse chromatographique*

Les paramètres d'analyse enregistrés pour l'étude de la vitamine sont les suivantes :

- **Phase stationnaire** : phase inversée en silice greffée ODS 2 C18 (40 × 250)
- **Phase mobile** : Méthanol/ Eau dans les proportions respectives 97/3 (v/v)
- **Débit** : 1 mL/min
- **Détection** : ultra-violet (UV) à 280 nm

La limite de détection de la 25-hydroxyvitamine D₃ est de 0,003 mg/L, soit 3 ng/mL. L'intégrateur enregistreur affiche les surfaces des pics obtenus ainsi que le temps de rétention de la vitamine.

➤ *Préparation de la gamme d'étalonnage de la 25-hydroxyvitamine D₃*

La solution standard de référence de la 25-hydroxyvitamine D₃ (1 mg/L), ainsi que de l'étalon interne (rétinyl acétate, 1 mg/L) ont servi à préparer les gammes de concentrations respectives de la Vitamine D (0 - 0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,8- 1- 1,2 mg/L) et du Rétinyl acétate (0-2-4-6-8-10-12 mg/L). Des dilutions successives ont été réalisées à partir de ces solutions et le choix des concentrations s'est fait en tenant compte des limites de détection (LD) et des concentrations physiologiques de la 25-hydroxyvitamine D₃. Ceci a permis de tracer les courbes d'étalonnage des solutions standards (**Annexe 14**). Les valeurs sériques de référence de la vitamine D sont : Deficient (< 20 ng/mL), Insuffisant (20-29 ng/mL), Suffisant (30-100 ng/mL) et Toxicité (> 100 ng/mL) (**Holick, 2007**).

➤ *Détermination de la concentration de la 25-hydroxyvitamine D₃ dans le sérum*

Les concentrations de 25-hydroxyvitamine D₃ dans les échantillons sériques sont obtenues à partir d'une formule résultant des droites d'étalonnage et des surfaces de pics obtenus. Pour le calcul de la concentration de la 25 (OH) D₃ (C), un facteur de correction K est réalisé en introduisant un étalon interne.

$$C = \frac{SD \text{ Ech}}{SRA \text{ Ech}} \times K$$

$$K = \frac{CD \text{ GE} \times SRA \text{ GE}}{SD \text{ GE}}$$

SD Ech : surface du pic de la 25-hydroxyvitamine D₃ dans l'échantillon de sérum.

CD GE : concentration de la 25-hydroxyvitamine D₃ déterminée à partir de la gamme étalon.

SRA GE : surface du pic du rétinyl acétate correspondant à 1 mg/L obtenue à partir de la gamme étalon.

SD GE : surface du pic correspondant à la concentration choisie de la 25-hydroxyvitamine D₃ à partir de la gamme étalon.

SRA Ech : surface du pic du rétinyl acétate dans l'échantillon de sérum correspondant à une concentration de 1 mg/L.

CD GE = 0,5 mg/L

SD GE = 46500

SRA GE = 52305

$$K = \frac{0,5 \times 52305}{46500}$$

$$K = 0,56$$

III.6. EXTRACTION DE L'ADN GENOMIQUE DES CELLULES MONONUCLEÉES HUMAINES

La détermination du polymorphisme du gène VDR nécessite au préalable l'extraction des cellules mononucléaires du sang périphérique (CMSP) ou peripheric blood mononuclear cells (PBMC). Ce qui est suivie de l'extraction de leur ADN génomique, de l'amplification des séquences d'ADN d'intérêt du gène VDR [l'exon 2 (Fok-1), de l'intron 8 (Bsm-1), de l'intron 8 (Apa-1) et de l'exon 9 (Taq-1)] et de leur séquençage.

III.6.1. Extraction des cellules mononucléées

L'extraction des cellules mononucléées a nécessité la séparation des cellules sanguines selon leur gradient de densité grâce à la solution de gradient Ficoll ou milieu de séparation des lymphocytes (MSL) à base de Ficoll. Ainsi, les éléments figurés du sang, déposés sur une solution de Ficoll de haute densité, ont subi durant une centrifugation, une migration différentielle qui conduit à leur séparation en fonction de la densité. Après une centrifugation, les érythrocytes et les granulocytes ont sédimenté au fond du tube et les cellules mononucléées ont formé un anneau à l'interface entre le plasma et le ficoll (**Janoly-Dumenil, 2008 ; Baskara-Yhuellou, 2013**) (**Annexe 15**).

Dans un tube conique propre de 17 x 100 mm contenant 4 mL de tampon phosphate « PBS » (Phosphate Buffer Saline), 4 mL de sang total ont été ajoutés. Le mélange obtenu est coulé délicatement sur un volume de 7 mL de solution de gradient Ficoll. Le tout est centrifugé pendant 15 min à 2 200 trs/min.

La totalité de l'anneau central blanc (contenant les lymphocytes et les monocytes) est prélevée, puis déposée dans un nouveau tube à centrifuger stérile de 15 mL. Un volume de 6 à 10 mL de RPMI-1640 [nitrate de calcium (NaHCO_3 , 2 g/L) sans L-Glutamine] est ajouté selon la présence apparente en Ficoll. L'ensemble est centrifugé à nouveau pendant 10 min à 1 500 trs/min. Puis après élimination du surnageant le culot cellulaire contenant les cellules mononuclées est récupéré pour être lavé.

➤ ***Lavage des cellules mononucléaires***

Le culot cellulaire obtenu est suspendu dans un volume de 2 à 3 mL de RPMI-1640 et centrifugé pendant 10 min à 1 500 trs/min. Le surnageant est éliminé et le sédiment cellulaire est suspendu à nouveau dans 2 mL de milieu complet [RPMI-1640 + 1 % de L-glutamine 2mM + 1 % acide aminé non essentiel (AANE) 100 mM + 1 % HEPES 10 mM + 1 % sodium pyruvate 1 mM + 1 % pénicilline (50 U/mL) / streptomycine (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)] supplémenté de sérum (10 % SVF) et l'ensemble est centrifugé pendant 10 min à 1 500 trs/min.

➤ ***Cryoconservation des cellules mononucléaires***

Les cellules mononucléaires sont introduites dans 1 mL de milieu approprié contenant 70 % milieu complet avec 20 % SVF + 10 % DMSO. L'ensemble est congelé dans de l'azote liquide puis conservé à $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

➤ ***Protocole de décongélation***

Les CMSP préalablement congelées sont traitées selon la méthode de **Janoly-Dumenil (2008)**. Elles sont rapidement décongelées au bain-marie à $37\text{ }^\circ\text{C}$. Puis, le sédiment cellulaire est dilué avec un volume approprié du même milieu complet supplémenté de sérum. L'ensemble est laissé au repos pendant 5 min, puis centrifugé pendant 5 min à 12 000 trs/min. Le surnageant contenant le reste de DMSO est éliminé. Un volume de 1 mL de suspension cellulaire, ainsi obtenu, est transféré dans 1 mL de milieu complet avec 20 % SVF. Un aliquote de 200 μL est ensuite prélevé pour l'extraction de l'ADN.

III.6.2. Extraction de l'ADN génomique au kit QIAGEN

L'extraction de l'ADN génomique humain a été réalisée en utilisant le kit commercial «Qiagen».

Les tampons de lyse (TL), de lavage 1 (AW1), de lavage 2 (AW2), d'élution (AE) nécessaires et les colonnes d'extraction ont donc été préparés à l'avance selon les indications du fabricant.

Après avoir suivi les procédures de décongélation des CMSP, la suspension cellulaire a été ramenée à température ambiante. Un volume de 200 μL de suspension lymphocytaire (5.10^6 cellules de lymphocytes) a été mis dans un tube de lyse (LT), puis un volume de 200 μL de tampon de lyse (AL) a été ajouté à la suspension cellulaire. Le tout a été homogénéisé au vortex pendant 15 sec et un volume de 20 μL de protéinase K (QP) a été transféré dans le tube de lyse (LT). Après homogénéisation (15 sec) et incubation (10 min à 56 °C), tout le lysat a été transféré délicatement dans une colonne Qiagen.

Un volume de 200 μL d'éthanol 96 °C a été introduit dans la colonne Qiagen et l'ensemble a été centrifugé à 8 000 trs/min pendant 1 min. La colonne a été ensuite placée dans un nouveau tube de lavage (WT). Le tube contenant le filtrat est mis au rebut. Un volume de 500 μL de tampon de lavage 1 (AW1) a été ajouté à la colonne qui après centrifugation à 8 000 trs/min pendant 1 min, a été ensuite placée dans un nouveau tube de lavage (WT). Le tube contenant le filtrat a été mis au rebut. Un volume de 500 μL de tampon de lavage 2 (AW2) a été introduit dans la colonne. Puis après centrifugation à 14 000 trs/min pendant 3 min, la colonne a été placée dans un nouveau tube de lavage (WT). Le tube contenant le filtrat a été mis au rebut. La colonne a été placée dans un nouveau tube de lavage (WT) et centrifugée à 14 000 trs/min pendant 3 min, ce qui a permis d'éliminer toutes les traces de tampon de lavage. Pour décrocher l'ADN, la colonne a été placée dans un nouveau tube d'éluion (ET). Un volume de 200 μL de tampon d'éluion (AE) a été déposé au centre de la membrane et le tout est incubé à température ambiante (15 à 25 °C) pendant 1 min et centrifugé pendant 1 min à environ 8 000 trs/min afin d'éluier l'ADN de la membrane et le récupérer dans le tube eppendorf de 1,5 mL. L'ADN a été conservé à -20 °C pour permettre son utilisation dans la réaction d'amplication.

➤ ***Préparation du gel d'agarose***

Une masse de 0,7 g d'agarose a été pesée et mis dans un erlenmeyer. Cent μL de tampon TBE (40 mM Tris-Borate, 1 mM EDTA) y ont été ajoutés, puis le mélange obtenu a été agité et fondu par chauffage (100 °C) dans une micro-onde (**Annexe 16**) pendant 3 min. Un volume de 1 μL de SYBR[®] green I a été ajouté à la solution et l'ensemble a été refroidi jusqu'à 65 °C. Le gel obtenu a été coulé dans un moule (plateau de coulée) (**Annexe 17**) contenant un plateau de gel et un peigne à 16 dents pour créer des puits. L'ensemble a été laissé à la température ambiante jusqu'à la solidification du gel.

➤ ***Migration et visualisation sur le gel d'agarose***

Pour la migration, un volume de 5 μL d'un marqueur de poids moléculaire Smart Ladder 100 bp (Eurogentec, France) a été déposé dans le puits 1. De même, un volume de 10 μL d'ADN combiné au préalable au tampon de charge (5 μL) a été déposé dans le puits. Chaque puits

correspond à un échantillon différent. Les bandes de l'électrophorèse sont révélées à la lumière UV après 20 min de migration à 135 V (lampe à vapeur de mercure $\lambda = 312$ nm) dans la cuve de migration (**Annexe 18**) grâce au marquage au SYBR[®] green I qui s'intercale entre les bases de la molécule d'ADN bicaténaire. Ce marquage crée une fluorescence de couleur orangée en présence de rayonnement UV (**Fan et Margaret, 2001**).

III.7. AMPLIFICATION DES SEQUENCES D'INTERET DE L'ADN DU VDR

Le principe de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est basé sur l'amplification du gène grâce à des amorces spécifiques suivant des cycles thermiques de réaction. La PCR permet d'obtenir plusieurs copies du gène considéré.

Les concentrations des amorces (**Tableau I**) ont été tout d'abord ramenées à 10 μM sous une PSM III (**Annexe 19**) avant la réalisation des PCR. Pour y arriver selon les indications du fabricant les amorces lyophilisées ont été préalablement diluées dans des volumes d'eau milli Q appropriées afin d'obtenir des solutions mères de concentration 100 μM .

➤ *Fok-1 de l'Exon 2*

Une solution mère de 100 μM de l'amorce Fok-1R (sens) est obtenue par ajout de 654 μL d'eau milli Q au tube contenant 65,4 nM de Fok-1R. Par contre, avec l'amorce lyophilisée Fok-1F (anti-sens) de 54,2 nM, un volume de 542 μL d'eau milli Q a été ajouté.

➤ *Bsm-1 de l'Intron 8*

Une solution mère de 100 μM de l'amorce lyophilisée Bsm-1R (sens) de 51,6 nM est obtenue en ajoutant 516 μL d'eau milli Q. Quant à celle de l'amorce Bsm-1F (anti-sens) de 49,3 nM est obtenue après ajout d'un volume de 493 μL d'eau milli Q.

➤ *Apa-1 de l'Intron 8*

Une solution mère de 100 μM de l'amorce d'Apa-1R (sens) est obtenue après ajout de 508 μL d'eau milli Q à 50,8 nM d'Apa-1R. Quant à la solution mère de 100 μM de l'amorce Apa-1F (anti-sens) de 65,8 nM, elle est obtenue en ajoutant 658 μL d'eau milli Q.

➤ *Taq-1 de l'Exon 9*

Une solution mère de 100 μM de l'amorce de Taq-1R (sens) de 53,6 nM est obtenue en ajoutant 536 μL d'eau milli Q. La solution mère de l'amorce Taq-1F (anti-sens) de 46,8 nM est obtenue après ajout de 468 μL d'eau milli Q.

Pour les différents Mix de PCR, des solutions filles de chaque amorce (sens et anti-sens) de concentration 10 μM ont été utilisées. Ces solutions filles ont été reconstituées en diluant au

1/10 les concentrations des solutions mères de chaque amorce (sens et anti-sens) avec de l'eau milli Q.

La préparation du Mix réactionnel de chaque PCR a nécessité un mélange réactionnel de 25 µL constitué de 16,375 µL d'eau milli Q, de 5 µL de 5×HOT FIREpol® Blend Master Mix [FIREPol® DNA polymérase, tampon (5 x Blend Master Mix Buffer), MgCl₂ (7,5 mM) et dNTPs (2 mM)], 0,625 µL de chaque amorce (10 µM) (amorces sens et anti-sens spécifiques) et 3 µL d'ADN matrice préalablement extrait.

III.7.1. Réalisation de la réaction de polymérisation en chaîne

La réalisation des PCR de détection des gènes des Single Nucleotide Polymorphisms du VDR s'est faite selon les conditions suivantes :

➤ *Fok-1 (rs2228570) de l'Exon 2*

Un segment de 267 pb de l'Exon 2 contenant le polymorphisme Fok-1 (rs2228570) est amplifié en utilisant 5'- AGC TGG CCC TGG CAC TGA CTC TGG CTC- 3', 5'- ATG GAA ACA CCT TGC TTC TTC TCC CTC- 3' (**Tableau II**) (**Rizk et al., 2014 ; Hamadé et al., 2014 ; Rashedi et al., 2014**).

Le mix de PCR de l'Exon 2 a été amplifié dans un thermocycleur (**Annexe 20**) par une dénaturation initiale à 94 °C pendant 5 min, suivie par 35 cycles comprenant une dénaturation initiale à 94 °C pendant 30 sec, une hybridation à 51 °C pendant 30 sec et une élongation à 72 °C d'une minute. L'amplification est achevée par une élongation finale de 7 min (**Tableau II**). Puis 10 µL du mélange réactionnel ont servi à la migration sur un gel d'agarose à 2 % contenant du SYBR® green I et visualisés par un transilluminateur UV. La taille des fragments a été déterminée en utilisant une échelle de 100 pb.

➤ *Bsm-1 (rs1544410) de l'Intron 8*

Un segment de 822 pb de l'intron 8 contenant le polymorphisme Bsm-1 (rs1544410) est amplifié en utilisant 5'- CAA CCA AGA CTA CAA GTA CCG CGT CAG TGA - 3', 5'-AAC CAG CGG AAG AGG TCA AGG GT- 3' (**Tableau II**) (**Mishra et al., 2013 ; Rashedi et al., 2014**).

Le mix de PCR de l'intron 8 a été amplifié selon un programme de 35 cycles constitué d'une dénaturation initiale à 94 °C pendant 5 min, suivie d'une dénaturation initiale à 94 °C pendant 30 sec, d'une hybridation à 51 °C pendant 30 sec, d'une élongation à 72 °C d'une minute et d'une élongation finale de 7 min (**Tableau II**). Après l'amplification 10 µL du mélange réactionnel ont ensuite été migrés sur un gel d'agarose à 2 % contenant du SYBR®

green I et visualisés par un transilluminateur UV. La taille des fragments a été déterminée en utilisant une échelle de 100 pb.

➤ ***Apa-1 (rs7975232) de l'Intron 8***

Un segment de 195 pb de l'Intron 8 contenant les polymorphismes Apa-1 (rs7975232) est amplifié en utilisant 5'- GGT GGG ATT GAG CAG TGA - 3', 5'- ATC TTG GCA TAG AGC AG - 3' (**Tableau II**) (**Chakraborty et al., 2009**).

Le programme PCR de l'intron 8 s'est réalisé en 35 cycles comportant une dénaturation initiale à 94 °C pendant 5 min, suivie d'une dénaturation initiale à 94 °C pendant 30 sec, une hybridation à 53 °C pendant 30 sec, une élongation à 72 °C d'une minute et une élongation finale de 7 min (**Tableau II**). Suite à cette amplification, 10 µL du mélange réactionnel ont ensuite été chargés dans un gel d'agarose à 2 % contenant du SYBR[®] green I et visualisés par un transilluminateur UV. La taille des fragments a été déterminée en utilisant une échelle de 100 pb.

➤ ***Taq-1 (rs731236) de l'Exon 9***

Un segment de 745 pb de l'Exon 9 contenant les polymorphismes Taq-1 (rs731236) est amplifié en utilisant 5' - CAG GCA GGG ACA GGG CCA GGT -3', 5'- GCA GGA AAG GGG TTA GGT TGG ACA 3' (**Tableau II**) (**Serrano et al., 2014 ; Hamadé et al., 2014 ; Rashedi et al., 2014**).

L'exon 9 a été amplifié dans un thermocycleur selon un programme de 35 cycles comprenant une dénaturation initiale à 94 °C pendant 5 min, suivie d'une dénaturation initiale à 94 °C pendant 30 sec, une hybridation à 69 °C pendant 30 sec, une élongation à 72 °C d'une minute et une élongation finale de 7 min (**Tableau II**). Une fois l'amplification réalisée, 10 µL du mélange réactionnel ont été chargés dans un gel d'agarose à 2 % contenant du SYBR[®] green I et visualisés par un transilluminateur UV. La taille des fragments a été déterminée en utilisant une échelle de 100 pb. Après toute PCR et avant le séquençage, il faut vérifier la qualité des produits de PCR obtenu.

III.7.2. Electrophorèse des produits de la PCR

La présence ou l'absence de produits PCR est confirmée par la révélation des bandes après la migration électrophorétique. En effet, un volume de 100 mL de tampon TBE 1X est ajouté dans le flacon contenant l'agarose (2 g), le tout est agité. Le mélange obtenu a été fondu par chauffage (100 °C) dans un four à micro-ondes (**Annexe 16**). Un volume de 1 µL de SYBR[®] green I est ensuite ajouté. L'agarose est laissée refroidir, puis le gel d'agarose est coulé dans le

plateau de coulée (**Annexe 17**). Ensuite, 10 μL d'amplicons sont déposés dans un puits pour chaque échantillon. Par ailleurs, 5 μL d'un marqueur de poids moléculaire Smart Ladder 100 bp (Eurogentec) et 10 μL du témoin négatif (contrôle de la qualité des amplifications) sont déposés isolément dans d'autres puits. Les bandes d'ADN de l'électrophorèse sont révélées à la lumière UV après 20 min de migration à 135V (lampe à vapeur de mercure $\lambda = 312 \text{ nm}$) passées dans la cuve de migration (**Annexe 18**).

III.7.3. Purification des produits de la PCR et leurs séquençages

➤ Purification des produits de la PCR

Avant le séquençage, les produits de PCR ont été purifiés selon les recommandations du fabricant du kit de purification utilisé (Roche Diagnostics, High Pure PCR product purification kit, Mannheim, Germany). Un volume de produit PCR a été mis dans une micro-colonne munie d'un micro-tube de 2 mL auquel on a ajouté 5 volumes du tampon 1 (pH 6,6 ; 25 °C) composé de guanidine-thiocyanate (3M), de tris-HCl (10 mM) et de 5 % d'éthanol (v/v). Après mélange et centrifugation à 12 000 trs/min durant 2 min, 5 volumes de tampon 2 (pH 7,5 ; 25 °C) composé de NaCl (20 mM), de tris-HCl (2 mM) ont été ajoutés à la colonne après addition d'éthanol. Le mélange a été à nouveau centrifugé à 12 000 trs/min pendant 2 min, puis le produit de PCR est relavé avec 2 volumes de tampon 2 et centrifugé dans les mêmes conditions que précédemment pendant 3 min. La dernière étape a consisté à décrocher le fragment d'ADN à l'aide d'un volume TE (10 mM tris-HCl, pH 8,5 (25 °C)) après une centrifugation à 12 000 trs/min pendant 4 min. Le fragment d'ADN purifié fixé sur la membrane de la colonne, est recueilli dans un micro-tube propre et stérile de 1,5 mL connecté à cette colonne. Un dixième du volume du produit de PCR purifié obtenu a servi de contrôle. Après migration sur gel d'agarose (2 %) et visualisation des bandes d'ADN, les fragments d'ADN purifiés sont prêts à être séquencés.

➤ Séquençage des fragments d'ADN purifiés

Le séquençage des amplifias des quatre gènes d'intérêt du VDR est réalisé par la société Eurofilms MW/G opéron (plateforme de séquençage, Hopital cochin, France) après leur purification. Cependant, avant l'envoi, les amorces sens utiles de Fok-1, Bsm-1, Apa-1 et Taq-1 ont été déterminées pour le séquençage des gènes du VDR. Ainsi, 2 μL de l'amorce ont été ajoutés à 15 μL de produit PCR selon les recommandations de la plateforme de séquençage.

Le séquençage des fragments consiste à déterminer la taille précise, les codons et les séquences en acides aminées des fragments obtenus. Cette méthode requiert l'utilisation des

nucléotides fluorescents marqués par 4 fluorochromes différents. Une fois la réaction de séquence terminée, la taille des fragments obtenus est déterminée par chromatographie. Le séquenceur détecte la fluorescence sortant des colonnes de chromatographie, repérant ainsi les fragments d'ADN et leur taille précise. Le résultat de bases est présenté par la machine sous forme de courbes (Electrophorègramme) représentant la fluorescence détectée et à chaque marqueur correspond une couleur de courbe (rouge pour T, vert pour A, bleu pour C et noir pour G).

III.8. METHODES D'ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS

Les données ont été recueillies dans Excel 2013 pour les analyses biologiques et dans le logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2 pour les produits de séquençage. Les analyses statistiques des concentrations sont réalisées en utilisant le logiciel GraphPad Prism 5 Demo pour les variables quantitatives. Le test t apparié est utilisé pour comparer les moyennes. Les corrélations entre les données sont évaluées en utilisant le test de Pearson. Une valeur de $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative pour tous les tests. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart type de la moyenne.

Le logiciel XLSTAT 2017.7.48969 est utilisé pour la réalisation de l'analyse descriptive des données qualitatives des résultats du séquençage. Le logiciel R version 3.3.3 est utilisé pour l'analyse statistique des proportions par le test du Chi-deux (Chi-square, X^2) de comparaison de deux ou plusieurs proportions. Ainsi, une valeur de $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative.

RESULTATS ET DISCUSSION

I. RESULTATS

Cette étude a permis d'obtenir les résultats suivants :

I.1. CARACTERISTIQUES EPIDEMIOLOGIQUES DE LA POPULATION D'ETUDE

La moyenne d'âge de la population d'étude est de $39 \pm 0,63$ ans pour les PVVIH sous traitements antirétroviraux et de $32 \pm 1,23$ ans pour les PVVIH non traités avec des extrêmes de 18 à 49 ans. La moyenne d'âge des témoins, est de $31 \pm 0,67$ ans avec des extrêmes de 18 à 49 ans (**Tableau IV**).

I.2. PROFIL BIOCHIMIQUE DE LA POPULATION D'ETUDE

Parmi les paramètres biochimiques analysés dont le Calcium, le Phosphore, le Magnésium, les Phosphatases alcalines, l'Alanine aminotransférase, la Glycémie, la Créatinine, et l'Urée, seule la concentration du phosphore est significativement plus élevée chez les PVVIH traités ($79 \pm 11,46$ mg/L ; $p < 0,0001$) et chez les PVVIH non traités ($61 \pm 7,70$ mg/L ; $p < 0,0001$) que chez les témoins ($37 \pm 1,02$ mg/L). Les valeurs des autres paramètres sont dans l'intervalle des valeurs normales (**Tableau V**).

I.3. STATUT EN 25-HYDROXYVITAMINE D₃ ET EN PARATHORMONE DE LA POPULATION D'ETUDE

I.3.1. Chromatogrammes du standard de 25-hydroxyvitamine D₃ et des sérums des sujets

I.3.1.1. Chromatogramme du standard de la 25-hydroxyvitamine D₃

L'allure du rétinyle acétate (1 mg/L) (standard interne) apparaît sur le graphique sous forme d'un grand pic avec un temps de rétention de 4,37 minutes. Le pic de la 25 (OH) D₃ (25-hydroxyvitamine D₃) apparaît à 6,97 minutes (**Figure 17**).

I.3.1.2. Chromatogrammes des sérums des sujets

Les chromatogrammes des sérums des sujets (**Figures 18a et 18b**) présentent chacune une allure typique au chromatogramme standard. Cependant, le pic de la 25 (OH) D₃ est abaissé chez les témoins (**Figure 18a**) et effondré chez les patients VIH+ (**Figure 18b**) comparativement à celui du chromatogramme standard (**Figure 17**).

Tableau IV : Répartition de la population d'étude en fonction du sexe et de la moyenne d'âge

SUJETS	SEXE	AGE (ans) Valeurs moyennes	AGE (ans) Valeurs moyennes globales
TEMOINS (VIH-) N = 163	Femmes N = 98	28 ± 0,86	31 ± 0,67
	Hommes N = 65	34 ± 0,96	
PVVIH N = 163	PVVIH traités N = 120	Femmes N = 75 39 ± 0,78	39 ± 0,63
		Hommes N = 45 38 ± 1,06	
	PVVIH non traités N = 43	Femmes N = 28 32 ± 1,58	32 ± 1,23
		Hommes N = 15 32 ± 1,38	

Tableau V : Valeurs moyennes des paramètres biologiques de la population d'étude

PARAMETRES	TEMOINS (N=163)	Patients traités (N=120)	Patients non traités (N=43)	p value a	p value b	p value c
Phosphatase Alcaline (40 - 129 UI/L)	77 ± 1,75 ^a	122 ± 16,84	100 ± 5,18	0,0026*	< 0,0001*	0,2954
Calcium (90 - 110 mg/L)	100 ± 1,52 ^a	115 ± 1,56	108 ± 1,81	< 0,0001*	0,0163*	0,0030*
Phosphore (28 - 45 mg/L)	37 ± 1,02 ^{ab}	79 ± 11,46	61 ± 7,70	< 0,0001*	< 0,0001*	0,1948
Magnésium (16-23 mg/L)	19 ± 0,19 ^a	21 ± 0,22	19 ± 0,42	< 0,0001*	0,6594	0,0002*
Alanine aminotransférase (7 - 48 UI/L)	17 ± 1,00 ^a	23 ± 1,63	18 ± 0,83	0,0031*	0,8027	0,0171*
Glycémie (0,75 - 1,10 g/L)	0,90 ± 0,02	0,89 ± 0,01	0,87 ± 0,02	0,8279	0,5521	0,4240
Créatinine (5 - 12 mg/L)	8 ± 0,18	8 ± 0,26	8 ± 0,31	0,6113	0,6653	0,4389
Urée (0,10 - 0,35 g/L)	0,28 ± 0,01	0,27 ± 0,02	0,23 ± 0,02	0,4652	0,0065*	0,1772

a : Témoins vs Patients sous ARV, b : Témoins vs Patients sans ARV, c : Patients sous ARV vs Patients sans ARV, * *p* indique une valeur statistiquement significative. La différence est significative pour $p < 0,05$. Test t de student, test de Pearson.

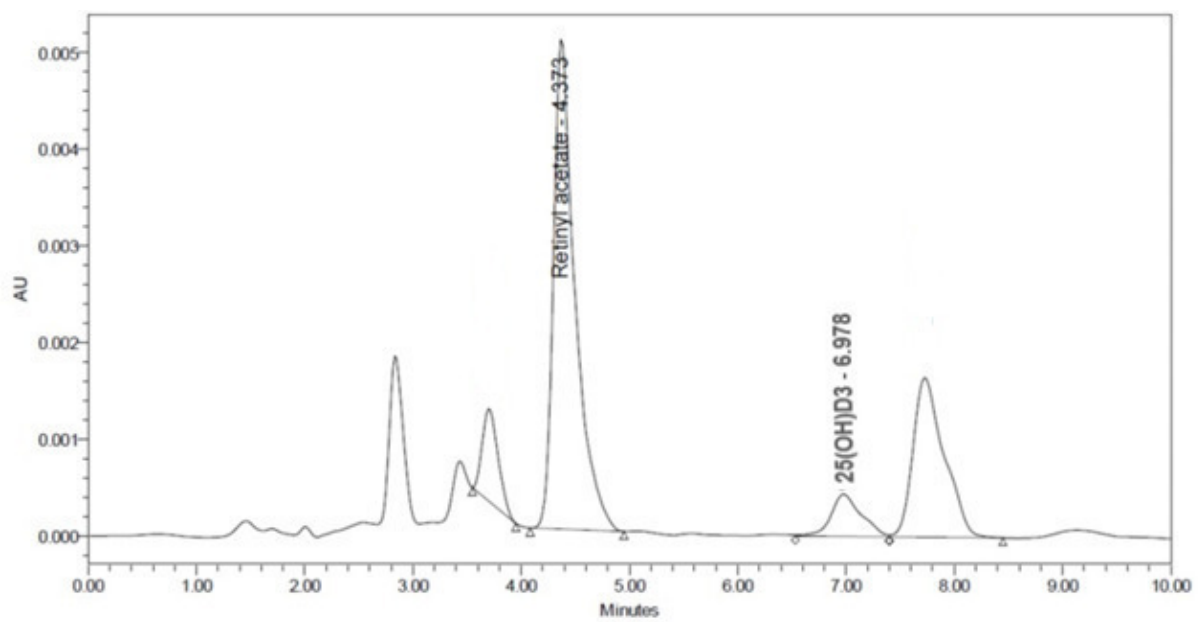


Figure 17 : Tracé chromatographique des standards de Retinyl acétate et de la 25 (OH) D₃ (25-hydroxyvitamine D₃)

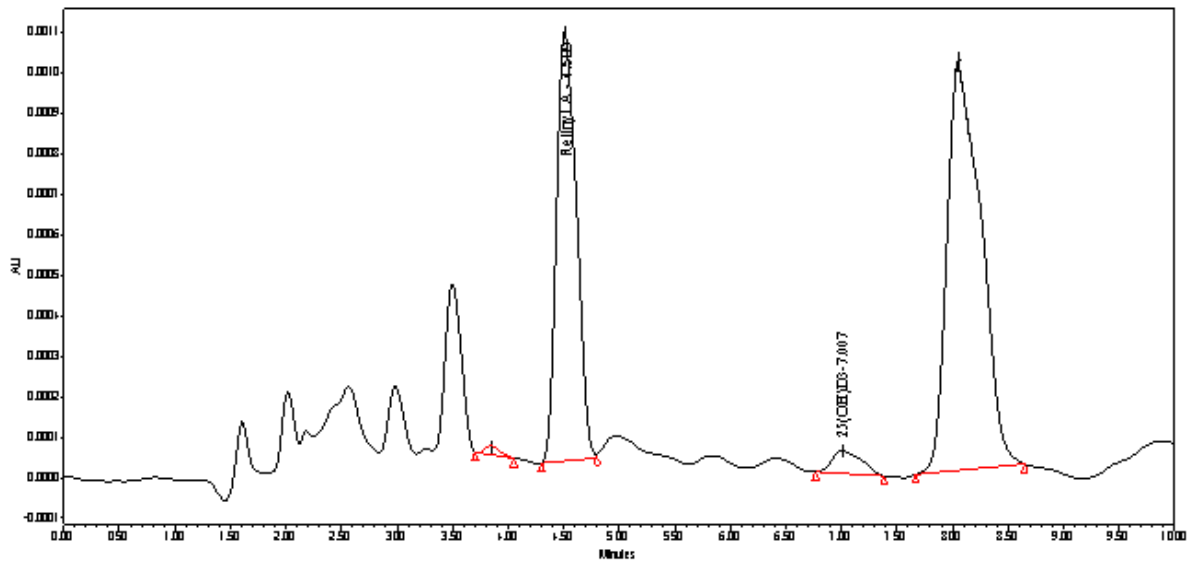


Figure 18a : Tracé chromatographique de la 25 (OH) D₃ de témoin VIH négatif

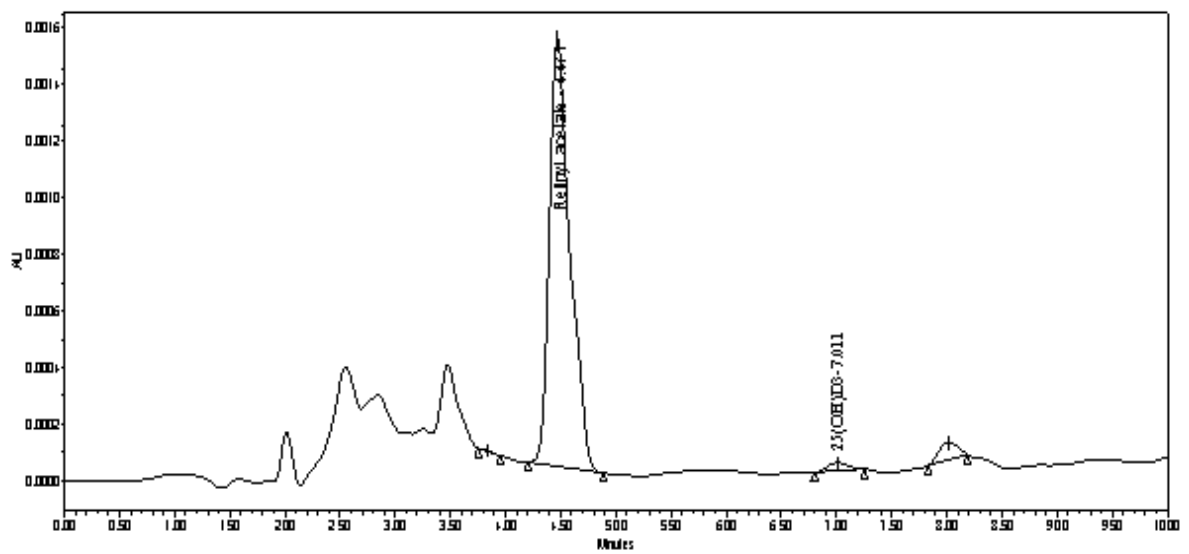


Figure 18b : Tracé chromatographique de la 25 (OH) D₃ de patient VIH positif

Figure 18 : Tracé chromatographique de la 25 (OH) D₃ sérique de témoin VIH négatif et de patient VIH positif

I.3.2. Concentrations moyennes en 25-hydroxyvitamine D₃ et en parathormone de la population d'étude

Une baisse significative ($p < 0,001$) en 25 (OH) D₃ a été observée chez les 120 PVVIH sous ARV ($28 \pm 2,20$ ng/mL) et chez les 163 témoins ($31 \pm 1,56$ ng/mL) par rapport à la concentration moyenne chez 43 PVVIH non traités ($48 \pm 2,07$ ng/mL). Cependant, seule la concentration en 25 (OH) D₃ des PVVIH traités ($28 \pm 2,20$ ng/mL) est en dessous de la limite inférieure de l'intervalle des valeurs normales (30-100 ng/mL).

La concentration moyenne de PTH se trouve dans l'intervalle des valeurs normales (10-65 pg/mL) aussi bien pour le PVVIH sous ARV ($25 \pm 3,66$ pg/mL), pour les PVVIH sans traitement ($23 \pm 2,12$ pg/mL) que pour témoins VIH négatifs ($26 \pm 2,26$ pg/mL), dans cette étude (**Tableau VI**). Par ailleurs, aucune différence significative n'est observée entre les concentrations de PTH des trois types de populations d'étude ($p = 0,58$).

I.3.3. Répartition de la population d'étude selon le statut en 25-hydroxyvitamine D₃ et en parathormone

Une déficience (< 20 ng/mL) en 25-hydroxyvitamine D₃ a été observée chez 12 % (5/43) des témoins VIH négatif, 50 % (60/120) des PVVIH sous ARV et 12 % (19/163) des PVVIH sans ARV. De même, une insuffisance (20-30 ng/mL) en 25-hydroxyvitamine D₃ a été relevée chez 44 % (72/163) des témoins, 33 % (40/120) des PVVIH sous ARV et 42 % (18/43) des PVVIH sans ARV. Enfin, des valeurs moyennes normales (≥ 30 ng/mL) en 25-OH vitamine D₃ ont été obtenues chez 44 % (72/163) des témoins, 17 % (20/120) des PVVIH sous ARV et 46 % (20/43) des PVVIH sans ARV (**Tableau VII**).

Au niveau de la PTH, seulement 10 % (12/120) de PVVIH sous ARV ont une hypoparathyroïdie (< 10 pg/mL). Un taux normal (10-65 pg/mL) de parathormone chez 96% (157/163) de témoins VIH négatif et chez la quasi-totalité des PVVIH sans ARV (100 % ; 43/43). Une hyperparathyroïdie (> 65 pg/mL) a été observée chez 4 % (6/163) des témoins VIH négatif contre 3 % (4/120) des PVVIH sous ARV (**Tableau VII**).

Tableau VI : Valeurs moyennes des 25 (OH) D₃ et de PTH de la population d'étude

PARAMETRES	TEMOINS (N=163)	Patients traités (N=120)	Patients non traités (N=43)	p value a	p value b	p value c
25 (OH) D ₃ (30-100 ng/mL)	31 ± 1,56	28 ± 2,20	48 ± 2,07	0,3776	< 0,0001*	< 0,0001*
PTH (10-65 pg/mL)	26 ± 2,26	25 ± 3,66	23 ± 2,12	0,8821	0,2982	0,5767

a : Témoins vs Patients sous ARV, b : Témoins vs Patients sans ARV, c : Patients sous ARV vs Patients sans ARV, * *p* indique une valeur statistiquement significative. La différence est significative pour $p < 0,05$. Test t de student, test de Pearson.

Tableau VII : Répartition de la population d'étude selon le statut en 25 (OH) D₃ et en Parathormone

PARAMETRES	Témoins N = 163		Patients sous ARV N = 120		Patients sans ARV N = 43	
	Effectif (%)	Valeur Moyenne	Effectif (%)	Valeur Moyenne	Effectif (%)	Valeur Moyenne
25 (OH) D₃						
Déficience < 20 ng/mL	19 (12)	14 ± 0,51	60 (50)	16 ± 0,46	5 (12)	19 ± 0,12
Insuffisance 20-30 ng/mL	72 (44)	28 ± 0,28	40 (33)	26 ± 0,35	18 (42)	26 ± 0,37
Suffisance ≥ 30 ng/mL	72 (44)	38 ± 0,96	20 (17)	44 ± 1,40	20 (46)	50 ± 1,65
Parathormone						
Insuffisance < 10 pg/mL	0 (0)	0	12 (10)	7 ± 0,21	0 (0)	0
Normale 10-65 pg/mL	157 (96)	25 ± 1,69	104 (87)	28 ± 1,95	43 (100)	25 ± 2,09
Elevée > 65 pg/mL	6 (4)	80 ± 0,15	4 (3)	102 ± 0,18	0 (0)	0

I.3.4. Statut en vitamine D₃ et parathormone de la population d'étude selon le taux de lymphocytes T CD4+

Chez les patients non traités, la concentration de 25 (OH) D₃ décroît avec la diminution du taux de lymphocytes TCD4+, mais ces concentrations sont dans l'intervalle des valeurs normales de 25 (OH) D₃ (30-100 ng/mL) quel que soit le taux de TCD4+ (**Figure 19a**). Cependant, chez les patients sous trithérapie, les concentrations moyennes en 25 (OH) D₃ sont dans l'intervalle des valeurs normales de référence pour la tranche de lymphocytes T CD4+ supérieure à 500 cellules/mL ($32 \pm 2,41$ ng/mL) et celle comprise entre 200-349 cellules/mL ($31 \pm 2,29$ ng/mL). Par contre, une insuffisance en 25-hydroxyvitamine D₃ a été relevée chez les patients traités dont le taux de TCD4+ est compris entre 350-499 cellules/mL ($23 \pm 1,14$ ng/mL) et inférieur à 200 cellules/mL ($20 \pm 1,03$ ng/mL) (**Figure 19a**).

Quant à la parathormone, les concentrations moyennes sont dans l'intervalle des valeurs normales (10-65 pg/mL) quel que soit le taux de lymphocytes T CD4+ chez tous les PVVIH (**Figure 19b**).

I.3.5. Statut en 25-hydroxyvitamine D₃ et en parathormone selon l'âge

- Dans la tranche d'âge de 18-25 ans

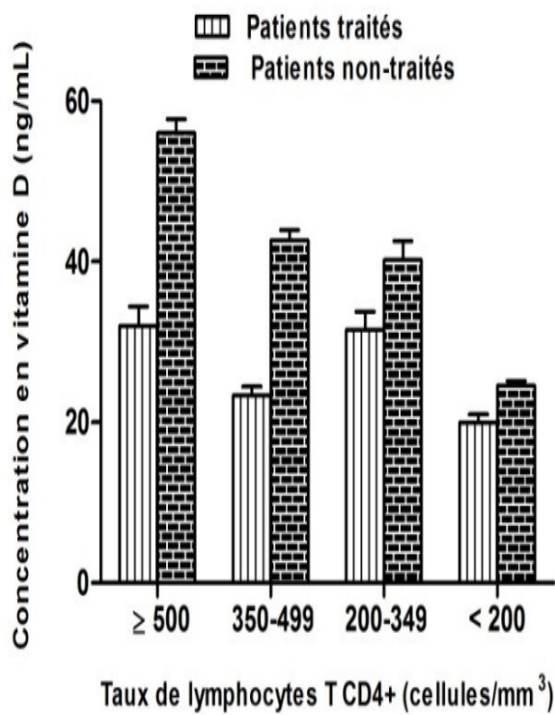
Les patients non traités ont des concentrations en 25 (OH) D₃ normales ($50 \pm 2,42$ ng/mL) par rapport à celles des témoins qui sont insuffisants ($27 \pm 0,56$ ng/mL) et des patients traités qui sont déficients ($16 \pm 0,66$ ng/mL) en cette vitamine (**Tableau VIII**).

Concernant la parathormone, les concentrations sont normales, mais légèrement plus élevées chez les patients traités ($20 \pm 1,47$ pg/mL) que chez les témoins ($19 \pm 1,02$ pg/mL) et chez les patients sans traitement ($16 \pm 0,73$ pg/mL) (**Tableau VIII**).

- Dans la tranche d'âge de 26-34 ans

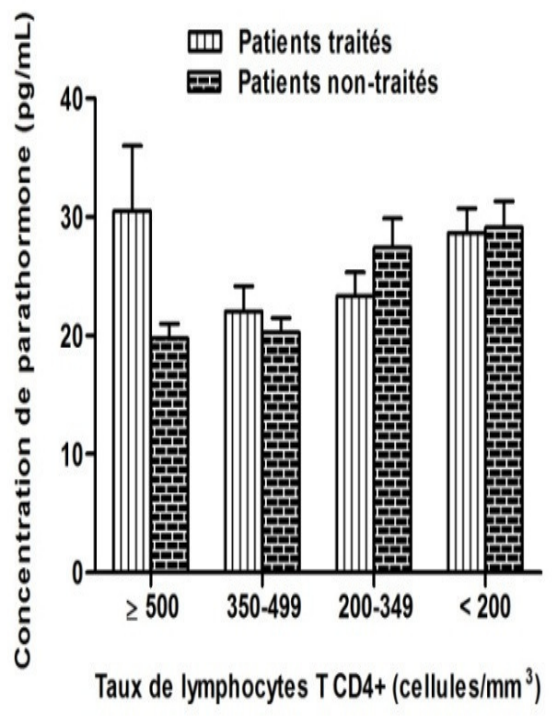
Les patients traités et non traités ont présenté une insuffisance en 25 (OH) D₃ de valeurs respectives égales à $29 \pm 2,98$ ng/mL et $26 \pm 0,67$ ng/mL comparativement aux témoins qui ont une valeur normale ($31 \pm 1,05$ ng/mL) (**Tableau VIII**).

Au niveau de la parathormone, seuls les PVVIH traités ont un faible taux ($7 \pm 0,56$ pg/mL) par rapport aux PVVIH non traités et aux témoins qui ont des taux normaux respectifs de $26 \pm 2,28$ et $30 \pm 2,27$ pg/mL (**Tableau VIII**).



(a)

Figure 19a : Concentrations en 25-hydroxyvitamine D₃



(b)

Figure 19b : Concentrations en parathormone

Figure 19 : Statut en 25-hydroxyvitamine D₃ (a) et en parathormone (b) des patients infectés par le VIH selon le taux de lymphocytes T CD4+

Tableau VIII : Statut en 25-hydroxyvitamine D₃ et en parathormone de la population d'étude selon l'âge

PARAMETRES	Tranche d'âges [18-25 ans]			Tranche d'âges [26-34 ans]			Tranche d'âges [35-49 ans]		
	Témoins	PVVIH traités	PVVIH non traités	Témoins	PVVIH traités	PVVIH non traités	Témoins	PVVIH traités	PVVIH non traités
25 (OH) D₃ (30 - 100 ng/mL)	27 ± 0,56	16 ± 0,66	50 ± 2,42	31 ± 1,05	29 ± 2,98	26 ± 0,67	31 ± 1,99	24 ± 1,84	34 ± 2,42
PTH (10 - 65 pg/mL)	19 ± 1,02	20 ± 1,47	16 ± 0,73	26 ± 2,28	7 ± 0,56	30 ± 2,27	29 ± 3,35	28 ± 2,39	28 ± 2,45

- Dans la tranche d'âge de 35-49 ans

Une insuffisance en 25 (OH) D₃ est observée chez les patients sous ARV ($24 \pm 1,84$ ng/mL) par rapport aux témoins ($31 \pm 1,99$ ng/mL) et aux PVVIH non traités ($34 \pm 2,42$ ng/mL) qui ont des valeurs normales (**Tableau VIII**).

Par ailleurs, les valeurs moyennes en parathormone chez les témoins ($29 \pm 3,35$ pg/mL), les patients sous ARV ($28 \pm 2,39$ pg/mL) et les sujets sans ARV ($28 \pm 2,45$ pg/mL), sont dans l'intervalle des valeurs normales de référence (**Tableau VIII**).

I.3.6. Statut en 25-hydroxyvitamine D₃ et en parathormone selon la combinaison thérapeutique utilisée

La majorité de la population sous traitement antirétroviral est caractérisée par une insuffisance (20 - 30 ng/mL) en 25 (OH) D₃ à l'exception de 21 (17,5 %) patients traités avec la combinaison Zidovudine/Lamivudine/Efavirenz (AZT-3TC-EFV) chez qui une déficience a été observée, soit $19 \pm 1,55$ ng/mL. Cependant, un niveau suffisant de 25 (OH) D₃ n'a été observé que chez les patients traités avec TDF-3TC-LPV/r ($32,0 \pm 1,22$ ng/mL) (**Tableau IX**).

L'ensemble de la population sous traitement antirétroviral quel que soit le sexe et le type de traitement antirétroviral a présenté un taux normal de PTH (**Tableau IX**).

I.3.7. Statut en 25-hydroxyvitamine D₃ et en parathormone selon le sexe des patients traités et le type de combinaison antirétrovirale

Chez les femmes

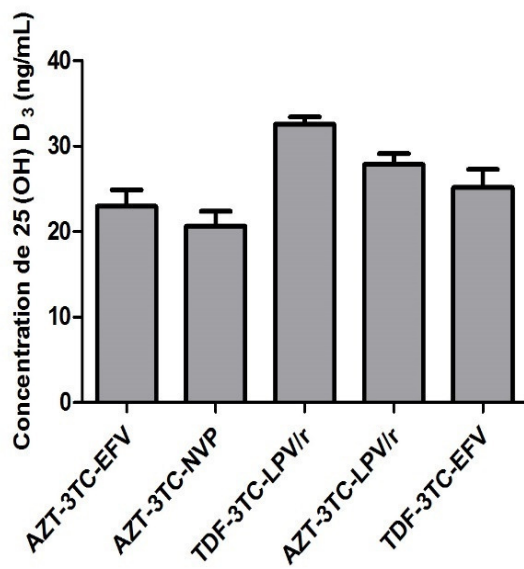
Les patientes sous TDF-3TC-LPV/r ont eu une concentration normale (30 – 100 ng/mL) de vitamine D. Cependant, une déficience en vitamine D a été observée chez celles traitées avec AZT-3TC-NVP. En revanche, une insuffisance en vitamine D a été constatée chez les PVVIH traitées avec les combinaisons AZT-3TC-EFV, AZT-3TC-LPV/r ou TDF-3TC-EFV (**Figure 20a**).

Quant aux concentrations de PTH, elles sont normales quelle que soit la combinaison d'antirétroviraux, car leurs concentrations sont toutes supérieures à 10 pg/mL. Cependant, la concentration de PTH a été faible chez les femmes traitées avec TDF-3TC-LPV/r par rapport à celles utilisant les autres combinaisons (**Figure 20b**).

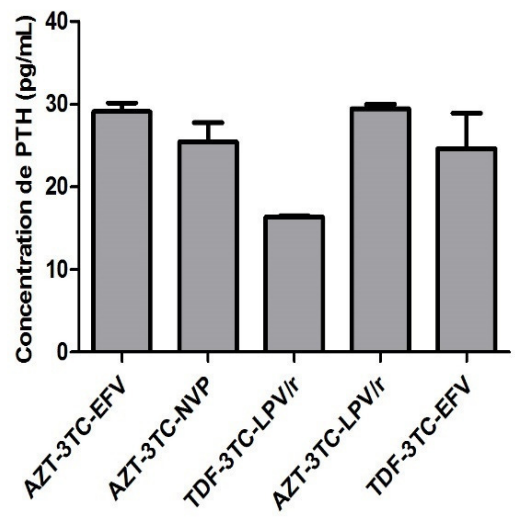
Tableau IX : Répartition et concentrations de 25 (OH) D₃ et de PTH de la population sous antirétroviraux

PARAMETRES	Effectif (%)	25 (OH) D ₃ (ng/mL)	PTH (pg/mL)
Genre			
Femmes	75 (62,5)	23 ± 1,21	26 ± 1,81
Hommes	45 (37,5)	23 ± 1,82	29 ± 3,86
Combinaisons d'antirétroviraux			
AZT-3TC-EFV	21 (17,5)	19 ± 1,55	26 ± 0,98
AZT-3TC-NVP	40 (33,3)	24 ± 1,68	22 ± 2,31
TDF-3TC-LPV/r	11 (9,2)	32 ± 1,22	18 ± 0,27
AZT-3TC-LPV/r	11 (9,2)	28 ± 1,18	29 ± 0,60
TDF-3TC-EFV	37 (30,8)	22 ± 1,81	29 ± 4,19

AZT: Zidovudine ou 3'-azido-3'-dideoxythymidine ; 3TC: Lamivudine ; EFV: Efavirenz ; NVP: Nevirapine ; TDF: Tenofovir disoproxil fumarate ; LPV/r: Lopinavir/ritonavir



(a)



(b)

Figure 20: Concentrations de 25 (OH) D₃ (a) et de PTH (b) des patients infectés de sexe féminin sous ARV

Chez les hommes

Les patients sous AZT-3TC-EFV et TDF-3TC-EFV ont une déficience (< 20 ng/mL) en vitamine D. Cependant, une insuffisance en vitamine D a été observée chez ceux qui étaient sous AZT-3TC-NVP et AZT-3TC-LPV/r, car leurs taux sont inférieurs à 30 ng/mL. En revanche, ceux qui sont traités avec la combinaison TDF-3TC-LPV/r ont eu un taux suffisant de vitamine D (**Figure 21a**).

Quant aux concentrations de PTH, elles sont normales (>10 pg/mL) quelle que soit la combinaison d'antirétroviraux même si un faible taux a été noté chez les hommes traités avec AZT-3TC-EFV, AZT-3TC-NVP et TDF-3TC-LPV/r par rapport à ceux traités avec les autres combinaisons (**Figure 21b**).

I.3.8. Statut en 25-hydroxyvitamine D₃ et en parathormone selon l'âge et le taux de lymphocytes T CD4⁺ et le type de combinaison antirétrovirale

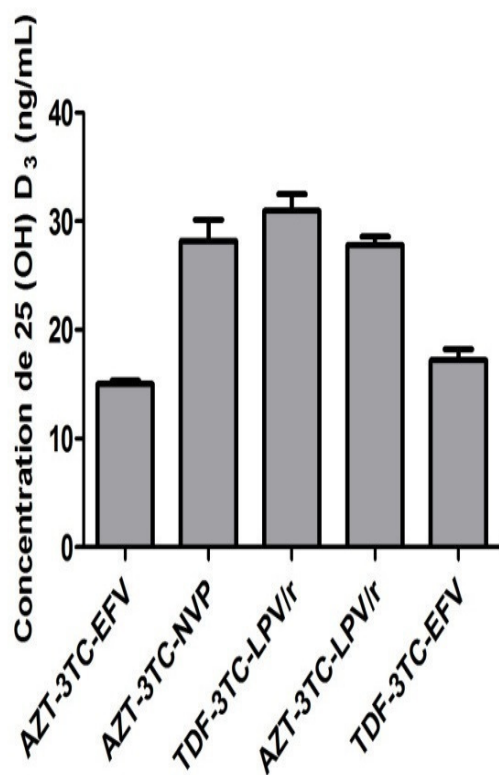
Chez les patients âgés de 18 à 25 ans ; une déficience en 25 (OH) D₃ ($11 \pm 0,08$ ng/mL) est observée chez les patients sous AZT-3TC-NVP ayant un taux de lymphocytes T CD4⁺ supérieur à 500 cell/mm³, une suffisance en 25 (OH) D₃ pour ceux traités avec AZT-3TC-LPV/r ayant des tranches de CD4⁺ supérieures à 500 cell/mm³ et entre 200-349 cell/mm³ respectivement ($39 \pm 0,16$ ng/mL ; $31 \pm 0,18$ ng/mL). Puis une insuffisance en 25 (OH) D₃ ($22 \pm 0,16$ ng/mL) a été observée chez les patients traités avec TDF-3TC-EFV ayant un taux de lymphocytes T CD4⁺ compris entre 350-499.

De même, une insuffisance en 25 (OH) D₃ a été observée chez les patients âgés de 26-34 ans ayant un taux de lymphocytes T CD4⁺ supérieur à 500 cell/mm³ et traités avec AZT-3TC-NVP ($28 \pm 0,14$ ng/mL) et TDF-3TC-EFV ($20 \pm 0,67$ ng/mL). Il en est de même pour ceux traités avec AZT-3TC-EFV ($23 \pm 0,14$ ng/mL), AZT-3TC-NVP ($20 \pm 0,14$ ng/mL) et TDF-3TC-EFV ($20 \pm 0,26$ ng/mL) de la tranche de lymphocytes T CD4⁺ compris entre 350-499. Par contre, une suffisance en 25 (OH) D₃ y a été observée chez ceux traités avec TDF-3TC-LPV/r ($38 \pm 0,37$ ng/mL).

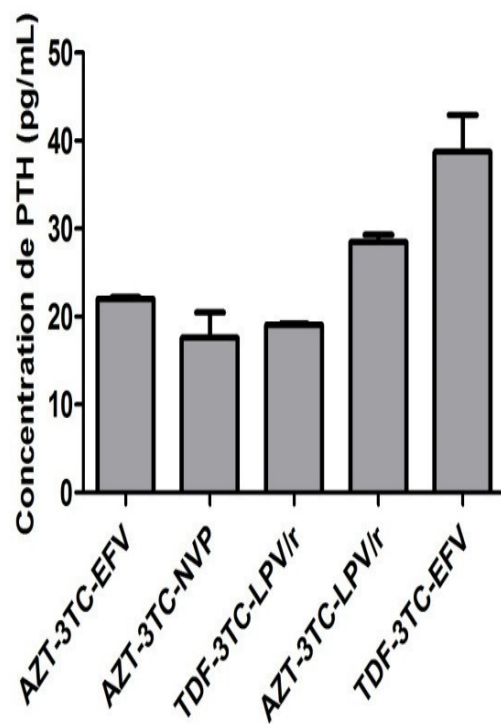
De plus, une insuffisance en 25 (OH) D₃ a été observée chez ceux âgés de 35-49 ans traités avec AZT-3TC-EFV ($23 \pm 0,93$ ng/mL) de la tranche de 350-499 cell/mm³ et ceux traités avec AZT-3TC-NVP de la tranche de 350-499 cell/mm³ et celle comprise entre 200-349 respectivement ($28 \pm 0,14$ ng/mL ; $20 \pm 0,14$ ng/mL) et ceux traités avec AZT-3TC-LPV/r ($21 \pm 0,14$ ng/mL) TDF-3TC-EFV ($20 \pm 0,42$ ng/mL) de la tranche comprise entre 200-349 cell/mm³. Par ailleurs, une déficience en 25 (OH) D₃ a été observé chez ceux traités avec AZT-3TC-EFV ($13 \pm 0,68$ ng/mL) et avec AZT-3TC-NVP ($15 \pm 0,17$ ng/mL) ayant un taux de

lymphocytes T CD4+ inférieur à 200 cell/mm³. Cependant, chez tous les sujets traités avec TDF-3TC-LPV/r, un taux suffisant de 25 (OH) D₃ a été observé quels que soient l'âge et le taux de lymphocytes T CD4+ (**Tableau X**).

Quels que soient l'âge, le taux de lymphocytes T CD4+ et le type de traitement antirétroviral les concentrations en PTH sont normales (10 – 65 pg/mL) dans l'ensemble. Toutefois, des déficits en PTH ont été observés chez les individus âgés de 26 à 34 ans ayant des taux de lymphocytes T CD4+ entre 350 et 499 cell/mm³ traités avec AZT-3TC-EFV ($9 \pm 0,08$ pg/mL) ou avec TDF-3TC-EFV ($7 \pm 0,26$ pg/mL). Il en est de même pour ceux traités avec AZT-3TC-NVP quels que soient les tranches de lymphocytes T CD4+ (**Tableau XI**).



(a)



(b)

Figure 21 : Concentrations de 25 (OH) D₃ (a) et de PTH (b) des patients infectés de sexe masculin sous ARV

Tableau X : Concentrations de 25 (OH) D₃ pour chaque tranche d'âge, pour le taux de TCD4+ et combinaison thérapeutique

PARAMETRES		AZT-3TC-EFV (21)	AZT-3TC-NVP (40)	TDF-3TC-LPV/r (11)	AZT-3TC-LPV/r (11)	TDF-3TC-EFV (37)					
Tranches d'âges (ans)	Taux de TCD4+ (cell/mm ³)	Effectif (%)	Moyenne 25(OH)D ₃ (ng/mL)	Effectif (%)	Moyenne 25(OH)D ₃ (ng/mL)	Effectif (%)	Moyenne 25(OH)D ₃ (ng/mL)	Effectif (%)	Moyenne 25(OH)D ₃ (ng/mL)	Effectif (%)	Moyenne 25(OH)D ₃ (ng/mL)
18-25	> 500	0 (0)	0	2 (100)	11 ± 0,08	0 (0)	0	1 (50)	39 ± 0,16	0 (0)	0
	499-350	0 (0)	0	0 (0)	0	0 (0)	0	0 (0)	0	3 (100)	22 ± 0,16
	349-200	0 (0)	0	0 (0)	0	0 (0)	0	1 (50)	31 ± 0,18	0 (0)	0
	<200	0 (0)	0	0 (0)	0	0 (0)	0	0 (0)	0	0 (0)	0
26-34	> 500	0 (0)	0	2 (25,00)	28 ± 0,14	0 (0)	0	0 (0)	0	6 (60,00)	20 ± 0,67
	499-350	2 (100)	23 ± 0,14	2 (25,00)	20 ± 0,14	3 (100)	38 ± 0,37	0 (0)	0	4 (40,00)	20 ± 0,26
	349-200	0 (0)	0	4 (50,00)	35 ± 2,43	0 (0)	0	0 (0)	0	0 (0)	0
	<200	0 (0)	0	0 (0%)	0	0 (0)	0	0 (0)	0	0 (0)	0
35-49	> 500	7 (36,80)	35 ± 1,26	18 (60,0)	33 ± 1,51	3 (37,50)	33 ± 0,68	6 (66,70)	27 ± 1,13	0 (0)	0
	499-350	2 (10,60)	36 ± 0,09	3 (10,00)	22 ± 0,50	0 (0)	0	2 (22,20)	21 ± 0,14	1 (4,20)	20 ± 0,42
	349-200	7 (36,80)	23 ± 0,93	6 (20,00)	23 ± 0,74	3 (37,50)	29 ± 0,12	1 (11,10)	32 ± 0,16	15 (62,50)	30 ± 1,95
	<200	3 (15,80)	13 ± 0,68	3 (10,00)	15 ± 0,17	2 (25,00)	38 ± 0,15	0 (0)	0	8 (33,30)	31 ± 4,15

Tableau XI : Concentrations de PTH pour chaque tranche d'âge, pour le taux de TCD4+ et combinaison thérapeutique

PARAMETRES		AZT-3TC-EFV (21)		AZT-3TC-NVP (40)		TDF-3TC-LPV/r (11)		AZT-3TC-LPV/r (11)		TDF-3TC-EFV (37)	
Tranches d'âges (ans)	Taux de TCD4+ (cell/mm ³)	Effectif (%)	Moyenne PTH (pg/mL)	Effectif (%)	Moyenne PTH (pg/mL)	Effectif (%)	Moyenne PTH (pg/mL)	Effectif (%)	Moyenne PTH (pg/mL)	Effectif (%)	Moyenne PTH (pg/mL)
18-25	> 500	0 (0)	0	2 (100)	12 ± 0,12	0 (0)	0	1 (50)	30 ± 0,16	0 (0)	0
	499-350	0 (0)	0	0 (0)	0	0 (0)	0	0 (0)	0	3 (100)	22 ± 0,15
	349-200	0 (0)	0	0 (0)	0	0 (0)	0	1 (50)	32 ± 0,18	0 (0)	0
	<200	0 (0)	0	0 (0)	0	0 (0)	0	0 (0)	0	0 (0)	0
26-34	> 500	0 (0)	0	2 (25)	9 ± 0,13	0 (0)	0	0 (0)	0	6 (60)	12 ± 1,73
	499-350	2 (100)	9 ± 0,09	2 (25)	7 ± 0,09	3 (100)	18 ± 0,16	0 (0)	0	4 (40)	7 ± 0,26
	349-200	0 (0)	0	4 (50)	7 ± 0,21	0 (0)	0	0 (0)	0	0 (0)	0
	<200	0 (0)	0	0 (0)	0	0 (0)	0	0 (0)	0	0 (0)	0
35-49	> 500	7 (36,80)	32 ± 0,48	18 (60)	35 ± 3,85	3 (37,50)	17 ± 0,43	6 (66,70)	32 ± 0,08	0 (0)	0
	499-350	2 (10,60)	38 ± 0,10	3 (10)	23 ± 0,29	0 (0)	0	2 (22,20)	22 ± 0,20	1 (4,20)	40 ± 6,60
	349-200	7 (36,80)	27 ± 0,92	6 (20)	32 ± 1,56	3 (37,50)	17 ± 0,15	1 (11,10)	23 ± 0,23	15 (62,50)	33 ± 3,48
	<200	3 (15,80)	28 ± 0,26	3 (10)	30 ± 0,60	2 (25)	18 ± 0,15	0 (0)	0	8 (33,30)	35 ± 3,48

I.4. POLYMORPHISME DU GÈNE DU RECEPTEUR DE LA VITAMINE D

I.4.1. Résultats de la PCR des fragments d'ADN d'intérêt

Un total de 200 amplicons est obtenu après amplification des 4 gènes (Fok-1, Bsm-1, Apa-1 et Taq-1) du locus du VDR par PCR sur les 50 échantillons retenus pour l'étude du polymorphisme.

Pour valider chaque amplification, après la migration des amplicons sur le gel d'agarose aucune bande ne devrait apparaître dans les puits des échantillons control négatif (TN). En effet, aucune bande n'est apparue après la migration des témoins control négatif. Cependant, pour chaque échantillon (E) une bande unique est apparue (**Figures 22, 23, 24 et 25**).

I.4.2. Polymorphismes Fok-1, Bsm-1, Apa-1 et Taq-1 du gène du récepteur de la vitamine D

Le profil de migration de Fok-1 (exon 2) a révélé des bandes de 267 pb (**Figure 22**), tandis que celui de Bsm-1 (intron 8) a fait apparaître des bandes de 822 pb (**Figure 23**). De même, le profil de migration d'Apa-1 (intron 8) a mis en évidence des bandes de 195 pb (**Figure 24**) et celui de Taq-1 (exon 9) a révélé des bandes de 745 pb (**Figure 25**).

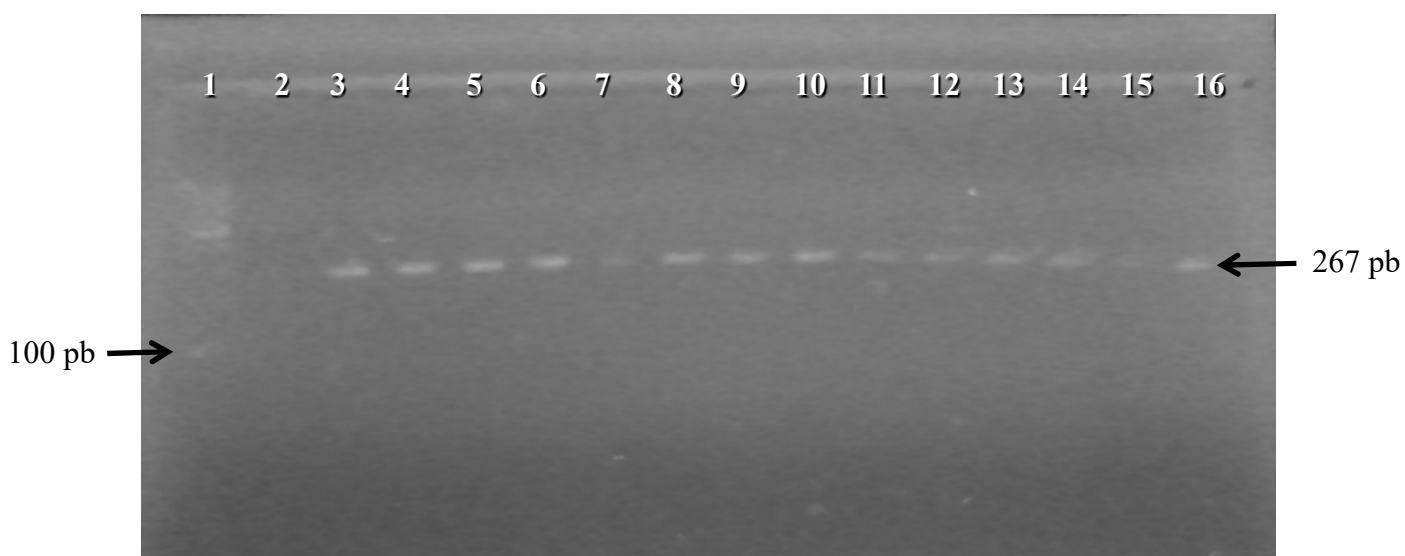


Figure 22 : Migration des amplicons Fok-1 (Exon 2)

Puit 1: PM Puit 2: TN Puit 3: E1 Puit 4: E2 Puit 5: E3 Puit 6: E4 Puit 7: E5 Puit 8: E6 Puit 9: E7
 Puit 10 : E8 Puit 11: E9 Puit 12: E10 Puit 13: E11 Puit 14: E12 Puit 15: E13 Puit 16: E14

PM : poids moléculaire (100 pb) TN : témoin négatif E : amplicon Exon 2 (Fok-1)

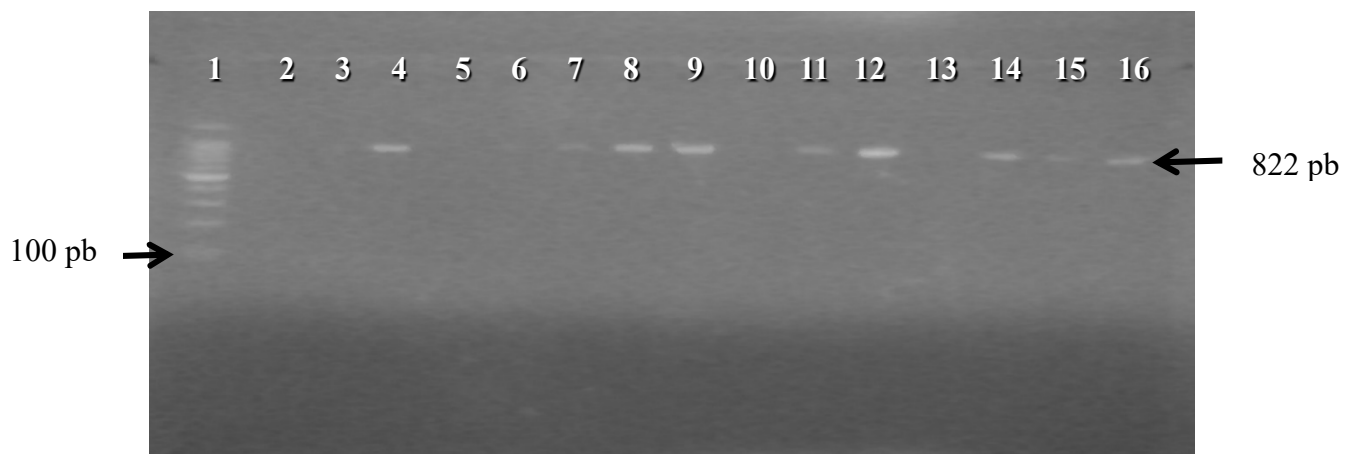


Figure 23 : Migration des amplicons Bsm-1 (intron 8)

Puit 1: PM Puit 2: TN Puit 3: E1 Puit 4: E2 Puit 5: E3 Puit 6: E4 Puit 7: E5 Puit 8: E6 Puit 9: E7
Puit 10: E8 Puit 11: E9 Puit 12: E10 Puit 13: E11 Puit 14: E12 Puit 15: E13 Puit 16: E14

PM : poids moléculaire (100 pb) TN : témoin négatif E : amplicon Intron 8 (Bsm-1)



Figure 24 : Migration des amplicons Apa-1 (Intron 8)

Puit 1: PM Puit 2: TN Puit 3: E1 Puit 4: E2 Puit 5: E3 Puit 6: E4 Puit 7: E5 Puit 8: E6 Puit 9: E7

Puit 10 : E8 Puit 11: E9 Puit 12: E10 Puit 13: E11 Puit 14: E12 Puit 15: E13 Puit 16: E14

PM : poids moléculaire (100 pb) TN : témoin négatif E : amplicon Intron 8 (Apa-1)

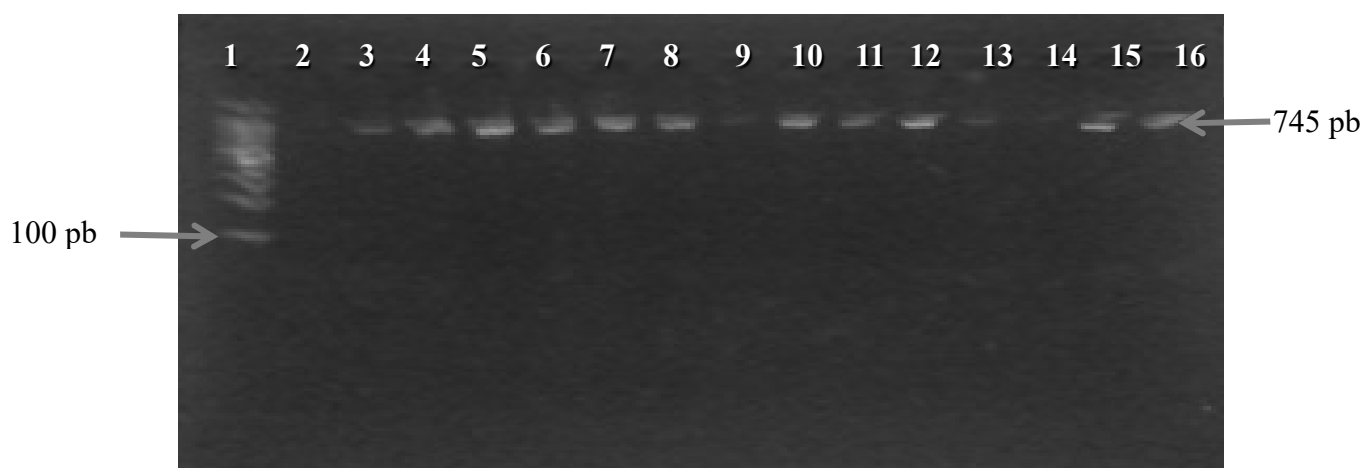


Figure 25 : Migration des amplicons Taq-1 (Exon 9)

Puit 1 : PM Puit 2: TN Puit 3: E1 Puit 4: E2 Puit 5: E3 Puit 6: E4 Puit 7: E5 Puit 8: E6 Puit 9: E7
 Puit 10 : E8 Puit 11: E9 Puit 12: E10 Puit 13: E11 Puit 14: E12 Puit 15: E13 Puit 16: E14

PM : poids moléculaire (100 pb) TN : témoin négatif E : amplicon Exon 9 (Taq-1)

I.4.3. Génotypage du gène du VDR

➤ Analyse des séquences obtenues

Les 200 amplicons du gène VDR ont été séquencés avec succès. Il s'est agi de 50 séquences de Fok-1, 50 séquences de Bsm-1, 50 séquences de Apa-1 et 50 séquences de Taq-1.

Chaque séquence du gène VDR a été alignée avec la séquence génomique de référence du VDR humain dans le sens 5' vers 3' (NCBI rs NG_008731.1) (**Annexe 21**) grâce au logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2. la lecture des séquences d'ADN s'est effectuée.

Le résultat de l'alignement des séquences issues des quatre sites polymorphiques Fok-1 rs 2228150 (exon 2), Bsm-1 rs 1544410 (intron 8), Apa-1 rs 7975232 (intron 8) et Taq-1 rs 731236 (exon 9 (codon 352)) du locus du VDR a montré la présence de mutations mononucléotidiques (**Tableau XII**).

Ainsi, les séquences Fok-1 ont montré deux sites de mutations g.30920T>C et g.30929T>C. Sur les deux positions la thymine (T) est substituée en cytosine (C), conduisant dans chaque cas à l'obtention d'un nouveau codon ACG (Thr). Cette substitution a touché les deux codons initiateurs de l'exon 2 du gène du VDR. Ainsi, la méthionine (Met) est substituée en thréonine (Thr) (**Annexe 22**).

Bsm-1 a aussi eu deux sites de mutations g.63510 G>A et g.63905 A>G ou A>C. Dans le premier site, la guanine (G) est remplacée par l'adénine (A) et dans le second site l'adénine (A) est substituée en guanine (G). Toutefois il est à noter sur ces 2 sites un polymorphisme élevé.

Apa-1 quant à lui a donné aussi deux sites de mutations g.65023 C>A et g.65024 A>C. Au niveau du premier, la cytosine (C) est remplacée par l'adénine (A) et dans le second l'adénine (A) est remplacée par la cytosine (C).

Taq-1 a montré un site de mutation g.65058T>C ou g.65058T>A (**Annexe 22**). Ainsi, la thymine (T) est substituée en adénine ou en cytosine (A ou C), conduisant respectivement aux codons ATA ou ATC ou TTA. Dans les deux premiers cas (ATA ou ATC) l'acide aminé est resté inchangé isoleucine (Ile) par contre le troisième TTA l'acide aminé est devenu la leucine (**Leu**) (**Annexe 22**).

Ces mutations sur le gène du VDR ont conduit à des génotypes mutants. Ces génotypes mutants sont **Thr1Met4** et **Thr1Thr4** pour le gène Fok-1; **AG, AA, GC, AC et GG** pour le gène Bsm-1; **AC** pour le gène Apa-1 et **Leu352** pour le gène Taq-1 (**Annexe 22**).

Tableau XII : Codons de l'analyse du séquençage

Exon 2 du VDR	Position des SNP	g.30920 T>C		g.30929 T>C		Génotypes
	Gène Fok-1	Codon	Acide aminé	Codon	Acide aminé	
	Sauvage	ATG	Met	ATG	Met	Met1Met4
	Mutants	ACG	Thr	ACG	Thr	Thr1Met4
		-	-	-	-	Thr1Thr4
Intron 8 du VDR	Position des SNP	g.63510 G>A		g.63905 A>G ou A>C		Génotypes
	Gène Bsm-1	Codon		Codon		
	Sauvage	CAG		AGA		GA
	Mutants	CAA		GGA		AG
		AAA		AAG		AA
		AAG		CAG		GC
		AGA		CCA		AC
		AGG		CGG		GG
		GCG		CTG		-
		TAA		GAA		-
		-		GAG		-
		-		GCA		-
		-		GCG		-
	-		GGC		-	
-		GTA		-		
Exon 9 du VDR	Position des SNP	g.65023 C>A		g.65024 A>C		Génotypes
	Gène Apa-1	Codon		Codon		
	Sauvage	CAC		CAC		CA
	Mutants	ACC		ACC		AC
Exon 9 du VDR	Position des SNP	g.65058 T>A ou T>C		-		Génotypes
	Gène Taq-1	Codon	Acide aminé	-		
	Sauvage	ATT	Ile	-		Ile352
	Mutants	ATA	Ile	-		
		ATC	Ile	-		
	TTA	Leu	-		Leu352	

I.4.4. Analyse du polymorphisme du gène du VDR

I.4.4.1. Distributions allélique et génotypique des échantillons d'étude

I.4.4.1.1. Prévalences allélique et génotypique de Fok-1

L'analyse du polymorphisme de Fok-1 a révélé la présence de mutation au niveau du codon d'initiation ATG en ACG aux sites g.30920 et g.30929. Elles sont respectivement de 87,5 % (g.30920) et 25 % (g.30929) dans les fragments d'ADN des sujets PVVIH (**Tableau XIII**).

La prévalence de l'allèle mutant C a été de 87,5 % dans les fragments d'ADN des sujets PVVIH contre 77,8 % chez les témoins VIH négatif. Cet allèle mutant C a été plus rencontré au premier site de mutation g.30920 C qu'au second site de mutation g.30929 C de l'exon 2 (**Tableau XIII**). La fréquence du génotype « simple mutant » Thr1Met4 ont été de 62,5 % chez les PVVIH contre 55,6 % chez les témoins VIH négatif ($p = 0,86$) (**Figure 26**).

I.4.4.1.2. Prévalences allélique et génotypique de Bsm-1

L'analyse du polymorphisme Bsm-1 a mis en évidence trois types de mutation, G → A de g.63510, A → G et A → C de g.63905. La prévalence de l'allèle sauvage G (g.63510 G) au premier site de mutation a été de 71,9 %, soit 23/32 dans les fragments d'ADN des PVVIH contre 33,3 %, soit 6/18 parmi ceux des témoins VIH négatif avec une différence significative ($p = 0,02$). Cependant, la prévalence de l'allèle mutant A (g.63510 A) dans les fragments d'ADN des témoins a été plus élevée, 66,7 % soit 12/18 ($p = 0,02$). Quant aux deux autres mutations [A (g.63905 A) ; C (g.63905 C)], leur prévalence chez les PVVIH est non significative par rapport aux témoins ($p > 0,05$). De plus, les prévalences du génotype mutant GG a été de 34,4 %, soit 11/32 chez les PVVIH et de 5,6 %, soit 1/18 chez les témoins VIH négatif avec une différence significative ($p = 0,05$) (**Tableau XIV**).

Tableau XIII : Distribution des allèles et mutations de Fok-1 (rs 2228570) de l'exon 2 du gène du VDR des échantillons d'étude

Fragment analysé	Position analysée	Échantillons	Échantillons	p value
		PVVIH N = 32	Témoins N = 18	
Fok-1 (rs 2228570)		N (%)	N (%)	
Allèles				
Exon 2	g.30920 T	4 (12,5)	4 (22,2)	0,62
	g.30920 C	28 (87,5)	14 (77,8)	0,62
	g.30929 T	24 (75)	14 (77,8)	0,86
	g.30929 C	8 (25)	4 (22,2)	1

allèle T (thymine) = sauvage, allèle C (cytosine) = mutant. Test du Chi-deux.

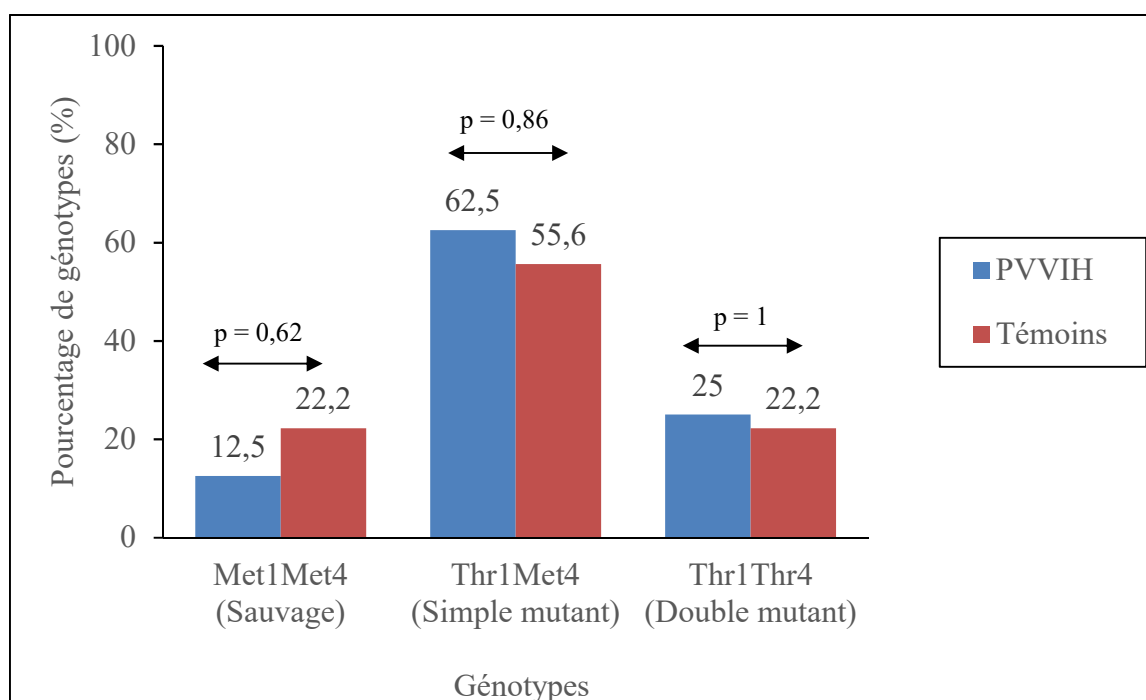


Figure 26 : Prévalence génotypique de Fok-1 des PVVIH et des témoins

Génotypes Met1Met4 (méthionine1 méthionine4), Thr1Met4 (thréonine1 méthionine4) et Thr1Thr4 (thréonine1 thréonine4);
Met1Met4 = (1 et 4) position du codon ATG traduit en Met sur la protéine du VDR. Test du Chi-deux.

Tableau XIV : Distribution allélique et géotypique de Bsm-1 (rs 1544410) de l'intron 8 du gène du VDR des échantillons d'étude

Fragment analysé	Position analysée	Échantillons PVVIH N = 32	Échantillons Témoins N = 18	p value
	Bsm-1 (rs 1544410)	N (%)	N (%)	
	Allèles			
	g.63510 G	23 (71,9)	6 (33,3)	0,02
	g.63510 A	9 (28,1)	12 (66,7)	0,02
	g.63905 A	12 (37,5)	6 (33,3)	1
	g.63905 G	17 (53,1)	8 (44,4)	0,77
	g.63905 C	3 (9,4)	4 (22,2)	0,4
Intron 8	Géotypes			
	GA	11 (34,4)	4 (22,2)	0,56
	GG	11 (34,4)	1 (5,6)	0,05
	AG	6 (18,7)	7 (38,9)	0,22
	AC	2 (6,2)	3 (16,7)	1
	AA	1 (3,1)	2 (11,1)	0,6
	GC	1 (3,1)	1 (5,6)	1

allèles G (guanine) et A (adénine) = sauvages, allèles G (guanine) et C (cytosine) = mutants ; géotype GA = sauvage, géotypes AG, AA, GC, AC et GG = mutants. Test du Chi-deux.

I.4.4.1.3. Prévalences allélique et génotypique d'Apa-1

L'analyse du polymorphisme Apa-1 du gène du VDR a montré que deux types de mutations C → A de g.65023 et A → C de g.65024. De plus, les deux types d'allèles mutants A, g.65023 A et C, g.65024 C ont été les plus observées dans 28,1 %, soit 9/32 des fragments d'ADN des infectés VIH positif. De même, le génotype mutant AC a été le plus fréquent avec 28,1 %, soit 9/32 des fragments d'ADN des infectés VIH positif contre 0 %, soit 0/18 pour les témoins avec une différence significative (p = 0,03) (**Tableau XV**).

I.4.4.1.4. Prévalences allélique et génotypique de Taq-1

L'analyse du polymorphisme de Taq-1 a révélé la présence de mutation au niveau du codon ATT en ATA ou ATC et TTA au site g.65058. De plus, la prévalence de l'allèle mutant A a été de 40,6 % dans les fragments d'ADN des sujets PVVIH contre 55,6 % chez les témoins VIH négatif (p=0,47).

Aussi, les prévalences génotype « sauvage » Ile352, 93,7 %, soit 30/32 et génotype « simple mutant » Leu352, 6,2 %, soit 2/32 des PVVIH ont été non significatives (p=1) par rapport à celles des témoins VIH négatif respectivement 94,4 %, soit 17/18 et 5,6 %, soit 1/18 (**Tableau XVI**).

I.4.4.1.5. Distribution des différents types de combinaisons de polymorphisme mononucléotidique (SNP) des échantillons de la population d'étude

Les résultats ont montré que les fragments d'ADN les plus affectés par les polymorphismes du VDR ont été plus retrouvés dans les échantillons des sujets PVVIH. Ainsi, par exemple, 8 (25 %), 5 (15,6 %) et 3 (9,3 %) des échantillons PVVIH ont le polymorphisme Fok-1 et les combinaisons Fok-1+Bsm-1+Apa-1, et Fok-1+Apa-1, respectivement (**Figure 27**). Cependant, la combinaison Fok-1+Bsm-1 est la plus observée dans cette étude dont 10 (31,25 %) parmi les 32 échantillons PVVIH contre 10 (55,5 %) parmi les 18 échantillons de sujets témoins (**Figure 27**).

Tableau XV : Distribution allélique et géotypique d'Apa-1 (rs 7975232) de l'intron 8 du gène du VDR des échantillons d'étude

Fragment analysé	Position analysée	Échantillons	Échantillons	p value
		PVVIH N = 32	Témoins N = 18	
	Apa-1 (rs 7975232)	N (%)	N (%)	
	Allèles			
Intron 8	g.65023 C	23 (71,9)	18 (100)	0,03
	g.65023 A	9 (28,1)	0 (0)	0,03
	g.65024 A	23 (71,9)	18 (100)	0,03
	g.65024 C	9 (28,1)	0 (0)	0,03
	Géotypes			
	CA	23 (71,9)	18 (100)	0,03
	AC	9 (28,1)	0 (0)	0,03

allèles C (cytosine) et A (adénine) = sauvages, allèles A (adénine) et C (cytosine) = mutants
géotype CA = sauvage, géotype AC = mutant. Test du Chi-deux.

Tableau XVI : Distribution allélique et génotypique de Taq-1 (rs 731236) de l'exon 9 (codon 352) du gène du VDR des échantillons d'étude

Fragment analysé	Position analysée	Échantillons	Échantillons	p value
		PVVIH N = 32	Témoins N = 18	
	Taq1 (rs 731236)	N (%)	N (%)	
	Allèles			
Exon 9	g.65058 T	19 (59,4)	6 (33,3)	0,14
	g.65058 A	13 (40,6)	10 (55,6)	0,47
	g.65058 C	0 (0)	2 (11,1)	0,24
	Génotypes			
	Ile352 (Sauvage)	30 (93,7)	17 (94,4)	1
	Leu352 (Simple mutant)	2 (6,2)	1 (5,6)	1

allèle T (thymine) = sauvage ; allèles A adénine) et C (cytosine) = mutants ;
génotype Ile352 (isoleucine352) ; génotype **Leu352** (leucine352) ;
Ile**352**= (**352**) position du codon ATT traduit en Ile sur la protéine du VDR. Test du Chi-deux.

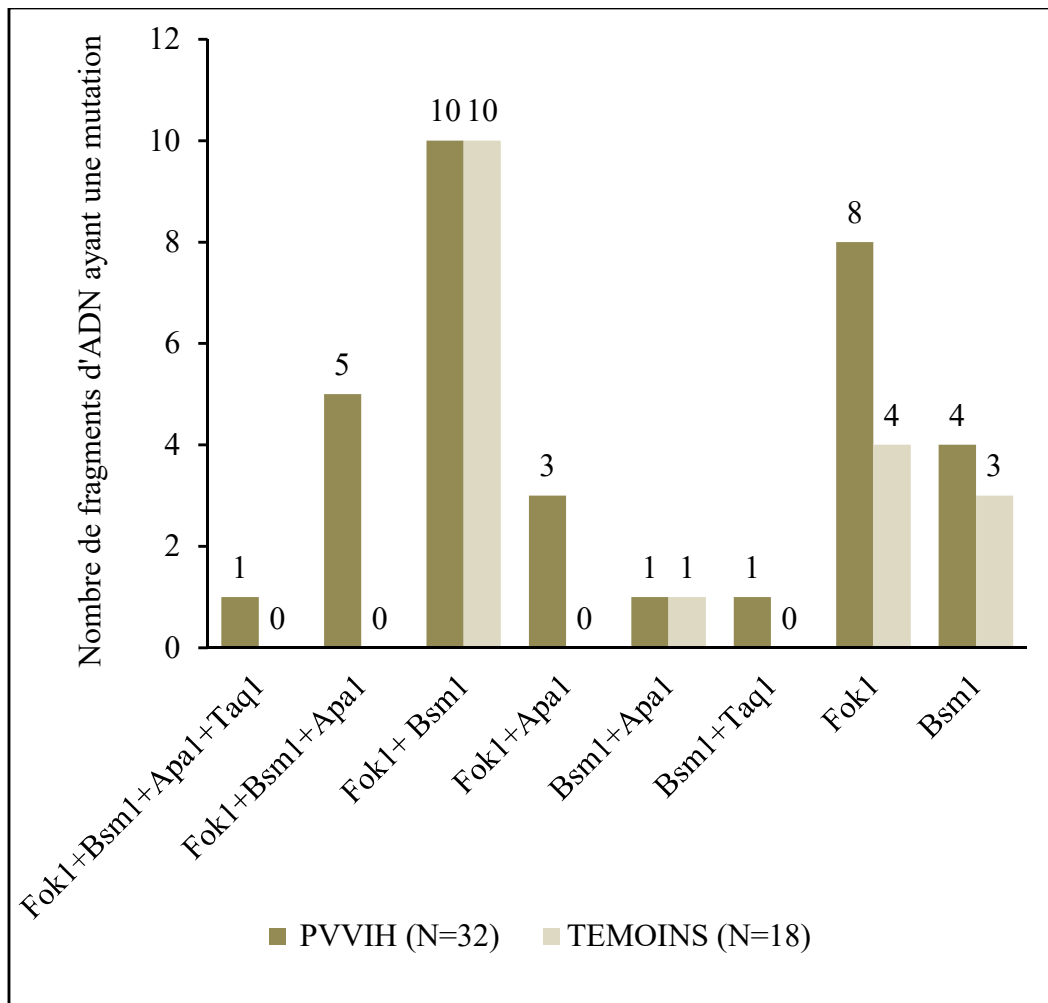


Figure 27 : Répartition des échantillons d'étude selon le type de combinaison de polymorphisme mononucléotidique (SNP) du gène du VDR

I.4.4.2. Distributions allélique et génotypique des séquences de VDR selon le statut en vitamine D₃

I.4.4.2.1. Statut en vitamine D₃ et prévalences allélique et génotypique de Fok-1

Des prévalences significativement ($p < 0,0001$) élevées de l'allèle mutant **C** (g.30920 **C**) ont été observées respectivement au niveau des fragments d'ADN issus de 16/19, soit 84,2 % PVVIH déficients en 25 (OH) D₃, 12/13, soit 92,3 % PVVIH insuffisants en 25 (OH) D₃ et 14/18, soit 77,8 % témoins suffisants en 25 (OH) D₃.

De plus, le génotype « simple mutant » **Thr1Met4** a été plus obtenu chez les PVVIH insuffisants en 25 (OH) D₃ (84,6 %) que chez les témoins suffisants en 25 (OH) D₃ et les PVVIH déficients en 25 (OH) D₃. Par contre, Le génotype « double mutant » **Thr1Thr4** a été plus observé chez les PVVIH déficients en 25 (OH) D₃ (36,8 %) (**Tableau XVII**).

I.4.4.2.2. Statut en vitamine D₃ et prévalences allélique et génotypique de Bsm-1

Les allèles mutants **A** (g.63510 **A**) et **C** (g.63905 **C**) ont été plus observés dans les fragments d'ADN issus des témoins, respectivement 66,7 % et 22,2 %. Cependant, l'allèle mutant **G** (g.63905 **G**) a été mis en évidence dans le fragment d'ADN Bsm-1 provenant des trois groupes d'individus étudiés (**Tableau XVIII**).

Dans cette étude également, le génotype mutant **GG** a été le plus observé et est commun aux fragments d'ADN issus des PVVIH [déficients (31,6 %) et insuffisants (38,5 %)]. Toutefois, 21,0 % et 38,9 % de ces fragments d'ADN de la séquence Bsm-1 issus respectivement des PVVIH déficients et des témoins ont eu le génotype mutant **AG**. Les autres génotypes mutants (**AC**, **AA** et **GC**) ont été présents dans les fragments d'ADN des échantillons issus des témoins (**Tableau XVIII**).

Tableau XVII : Polymorphisme Fok-1 (rs 2228570) selon le statut en vitamine D

Échantillons d'étude	GENOTYPES			p value	ALLELE g.30920 T>C		p value	ALLELE g.30929 T>C		p value
	Sauvage Met1Met4	Simple Mutant Thr1Met4	Double Mutant Thr1Thr4		T	C		T	C	
	N (%)	N (%)	N (%)		N (%)	N (%)		N (%)	N (%)	
PVVIH déficient en 25 (OH) D₃ (N=19)	3 (15,8)	9 (47,4)	7 (36,8)	0,11	3 (15,8)	16 (84,2)	< 0,0001	12 (63,2)	7 (36,8)	0,19
PVVIH insuffisant en 25 (OH) D₃ (N=13)	1 (7,7)	11 (84,6)	1 (7,7)	< 0,0001	1 (7,7)	12 (92,3)	< 0,0001	12 (92,3)	1 (7,7)	< 0,0001
Témoins suffisant en 25 (OH) D₃ (N=18)	4 (22,2)	10 (55,6)	4 (22,2)	0,05	4 (22,2)	14 (77,8)	0,003	14 (77,8)	4 (22,2)	0,003

allèle T (thymine) = sauvage, allèle C (cytosine) = mutant ;

génotypes Met1Met4 (méthionine1 méthionine4), **Thr1Met4** (thréonine1 méthionine4) et **Thr1Thr4** (thréonine1 thréonine4) ;

Met1Met4= (1 et 4) position du codon ATG traduit en Met sur la protéine du VDR. Test du Chi-deux.

Tableau XVIII : Polymorphisme Bsm-1 (rs 1544410) selon le statut en vitamine D₃

Échantillons d'étude	GENOTYPES						ALLELE g.63510 G>A		ALLELE g.63905 A>G ou A>C					
	GA	GG	AG	AC	AA	GC	G	A	A	G	C			
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)			
PVVIH déficients en 25 (OH) D₃ (N=19)	7 (36,8)	6 (31,6)	4 (21,0)	1 (5,3)	0 (0,0)	1 (5,3)	0,006	14 (73,7)	5 (26,3)	0,009	7 (36,8)	10 (52,6)	2 (10,5)	0,02
PVVIH insuffisants en 25 (OH) D₃ (N=13)	4 (30,8)	5 (38,5)	2 (15,4)	1 (7,7)	1 (7,7)	0 (0,0)	0,06	9 (69,2)	4 (30,8)	0,12	5 (38,5)	7 (53,8)	1 (7,7)	0,04
Témoins suffisants en 25 (OH) D₃ (N=18)	4 (22,2)	1 (5,6)	7 (38,9)	3 (16,7)	2 (11,1)	1 (5,6)	0,06	6 (33,3)	12 (66,7)	0,09	6 (33,3)	8 (44,4)	4 (22,2)	0,36

allèles G (guanine) et A (adénine) = sauvages, allèles G (guanine) et C (cytosine) = mutants ;
génotype GA = sauvage, génotypes AG, AA, GC, AC et GG = mutants. Test du Chi-deux.

I.4.4.2.3. Statut en vitamine D₃ et prévalences allélique et génotypique de Apa-1

Les allèles mutants **A** (g.65023 **A**) et **C** (g.65024 **C**) ont été plus observés dans les fragments d'ADN des échantillons issus des PVVIH insuffisants en 25 (OH) D₃, 61,5 % ($p = 0,43$). Il en est de même pour le génotype mutant **AC** (**Tableau XIX**).

I.4.4.2.4. Statut en vitamine D₃ et prévalences allélique et génotypique de Taq-1

L'analyse du polymorphisme Taq-1 a montré de fortes prévalences d'allèles sauvages **T** (g.65058 **T**) que de mutants **C** ou **A** (g.65058 **C** ou **A**) avec une différence significative ($p < 0,05$).

Il en est de même pour les prévalences génotypiques « sauvages » Ile352 et « mutants » Leu352 des fragments d'ADN des échantillons des PVVIH déficients en 25 (OH) D₃ (respectivement 94,7 % et 5,3 %), insuffisants en 25 (OH) D₃ et des témoins suffisants en 25 (OH) D₃ (respectivement 94,4 % et 5,6 %) (**Tableau XX**).

I.4.4.3. Prévalences allélique et génotypique du gène du VDR des échantillons de PVVIH déficients et insuffisants en 25 (OH) D₃ selon le taux de CD4+

I.4.4.3.1. Prévalences allélique et génotypique de Fok-1 et PVVIH déficients et insuffisants en 25 (OH) D₃ selon le taux de CD4+

La prévalence du génotype mutant est plus rencontrée dont 16/19, soit 84,21 % dans les fragments d'ADN provenant des PVVIH déficients en 25 (OH) D₃ ayant les taux de CD4+ en-dessous de 500 cell/mm³ et dans 87,5 % de ceux provenant des PVVIH insuffisants en 25 (OH) D₃ ayant des taux de CD4+ en-dessous de 350 cell/mm³ (**Figure 28**). Ces fragments sont essentiellement caractérisés par le génotype « simple mutant **Thr1Met4** » (**Tableau XXI**).

Tableau XIX : Polymorphisme Apa-1 (rs 7975232) selon le statut en vitamine D₃

Échantillons d'étude	GENOTYPES		ALLELE g.65023 C>A		ALLELE g.65024 A>C				
	CA	AC	C	A	A	C			
	p value		p value		p value				
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)			
PVVIH déficients en 25 (OH) D₃ (N=19)	18 (94,7)	1 (5,3)	< 0,0001	18 (94,7)	1 (5,3)	< 0,0001	18 (94,7)	1 (5,3)	< 0,0001
PVVIH insuffisants en 25 (OH) D₃ (N=13)	5 (38,5)	8 (61,5)	0,43	5 (38,5)	8 (61,5)	0,43	5 (38,5)	8 (61,5)	0,43
Témoins suffisants en 25 (OH) D₃ (N=18)	18 (100)	0 (0)	< 0,0001	18 (100)	0 (0)	< 0,0001	18 (100)	0 (0)	< 0,0001

allèles C (cytosine) et A (adénine) = sauvages, allèles A (adénine) et C (cytosine) = mutants ;
génotype CA = sauvage, génotype AC = mutant. Test du Chi-deux.

Tableau XX : Polymorphisme Taq-1 (rs 731236) selon le statut en vitamine D₃

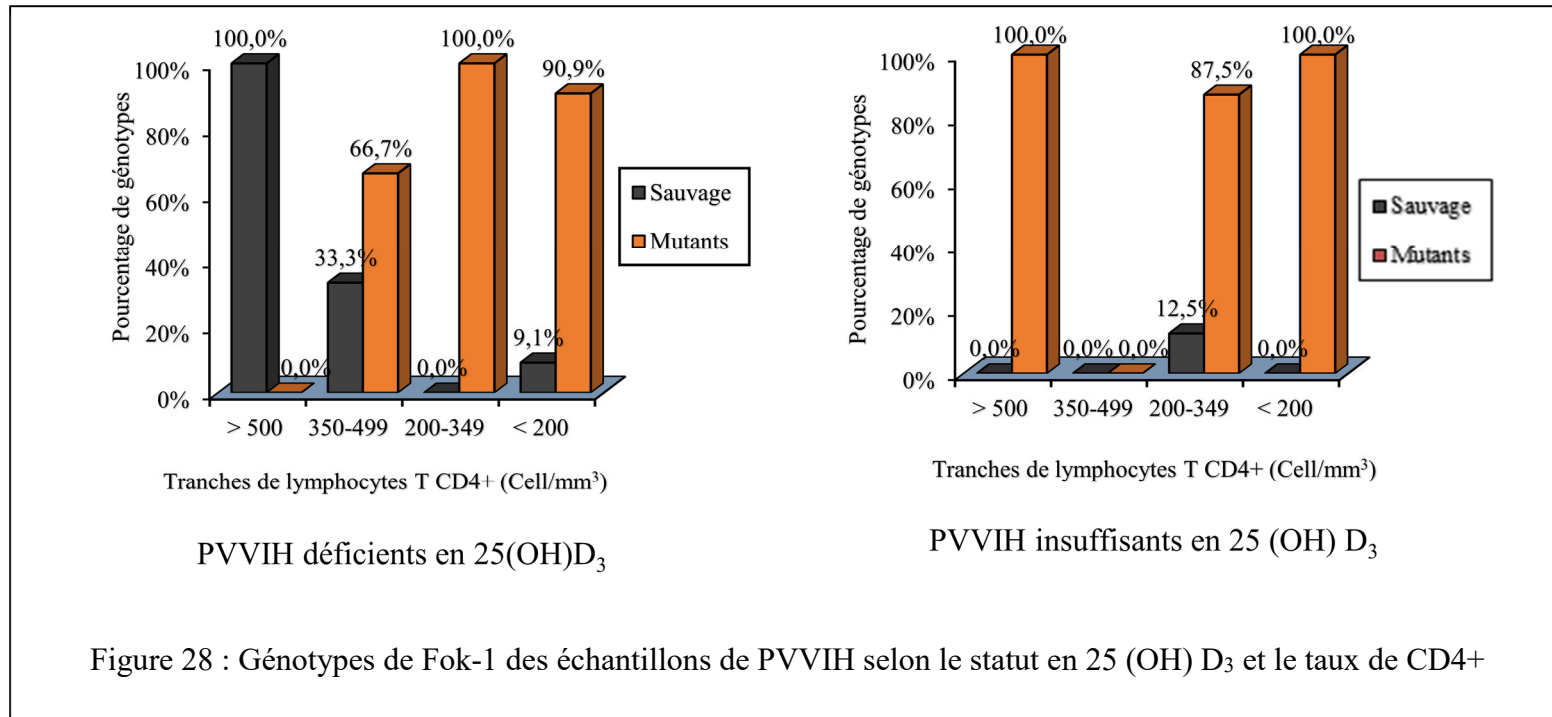
Échantillons d'étude	GENOTYPES			ALLELE g.65058 T>A ou T>C			
	Sauvage Ile352	Simple Mutant Leu352	p value	T	A	C	p value
	N (%)	N (%)		N (%)	N (%)	N (%)	
PVVIH déficient en 25 (OH) D₃ (N=19)	18 (94,7)	1 (5,3)	< 0,0001	13 (68,4)	6 (31,6)	0 (0)	< 0,0001
PVVIH insuffisant en 25 (OH) D₃ (N=13)	12 (92,3)	1 (7,7)	< 0,0001	6 (46,1)	7 (53,8)	0 (0)	0,007
Témoins suffisant en 25 (OH) D₃ (N=18)	17 (94,4)	1 (5,6)	< 0,0001	6 (33,3)	10 (55,6)	2 (11,1)	0,01

allèle T (thymine) = sauvage, allèles A (adénine) et C (**cytosine**) = mutants ; génotype Ile352 (isoleucine352), génotype **Leu352** (leucine352) ; Ile **352= (352)** position du codon ATT traduit en Ile sur la protéine VDR. Test du Chi-deux.

Tableau XXI : Statut en vitamine D₃ et prévalence du polymorphisme Fok-1 (rs 2228570) selon le taux de CD4+ des échantillons de PVVIH déficients et insuffisants en 25 (OH) D₃

Tranches de CD4+ (Cell /mm ³)	Échantillons de PVVIH déficients en 25 (OH) D ₃ (N = 19)					Échantillons de PVVIH insuffisants en 25 (OH) D ₃ (N=13)				
	Effectif	Sauvage Met1Met4	Simple Mutant Thr1Met4	Double Mutant Thr1Thr4	p value	Effectif	Sauvage Met1Met4	Simple Mutant Thr1Met4	Double Mutant Thr1Thr4	p value
> 500	1	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0,22	3	0 (0)	3 (100)	0 (0)	0,01
350-499	3	1 (33,3)	1 (33,3)	1 (33,3)	1	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	-
200-349	4	0 (0)	4 (100)	0 (0)	0,002	8	1 (12,5)	6 (75)	1 (12,5)	0,009
< 200	11	1 (9,1)	4 (36,4)	6 (54,5)	0,07	2	0 (0)	2 (100)	0 (0)	0,04

génotypes Met1Met4 (méthionine1 méthionine4), Thr1Met4 (thréonine1 méthionine4) et Thr1Thr4 (thréonine1 thréonine4) ; Met1Met4= (1 et 4) position du codon ATG traduit en Met sur la protéine du VDR. Test du Chi-deux.



I.4.4.3.2. Prévalences allélique et génotypique de Bsm-1 et PVVIH déficients et insuffisants en 25 (OH) D₃ selon le taux de CD4⁺

La prévalence du génotype mutant est plus rencontrée dans les fragments d'ADN provenant des PVVIH déficients en 25 (OH) D₃ quelle que soit la tranche de CD4⁺ et dans ceux provenant des PVVIH insuffisants en 25 (OH) D₃ ayant des taux de CD4⁺ au-dessus de 500 cell/mm³ et en-dessous de 350 cell/mm³ (**Figure 29**). Ces fragments sont essentiellement caractérisés par le génotype mutant GG (**Tableau XXII**).

I.4.4.3.3. Prévalences allélique et génotypique d'Apa-1 et PVVIH déficients et insuffisants en 25 (OH) D₃ selon le taux de CD4⁺

La prévalence du génotype mutant a été plus rencontrée dans les fragments d'ADN provenant du PVVIH déficient en 25 (OH) D₃ ayant les taux de CD4⁺ compris entre 200 et 349 cell/mm³ et dans ceux provenant des PVVIH insuffisants en 25 (OH) D₃ ayant des taux de CD4⁺ au-dessus de 500 cell/mm³ (66,7 %) et compris entre 200-349 cell/mm³ (75 %) (**Figure 30**). Ces fragments sont essentiellement représentés par le génotype mutant AC (**Tableau XXIII**).

I.4.4.3.4. Prévalences allélique et génotypique de Taq-1 et PVVIH déficients et insuffisants en 25 (OH) D₃ selon le taux de CD4⁺

La prévalence du génotype mutant est plus rencontrée dans les fragments provenant des PVVIH déficients en 25 (OH) D₃ ayant les taux de CD4⁺ compris en-dessus de 200 cell/mm³ (9,1 %) et dans le fragment Taq-1 provenant du PVVIH insuffisant en 25 (OH) D₃ ayant le taux de CD4⁺ au-dessus de 500 cell/mm³ (33,3 %) (**Figure 31**). Ces fragments sont essentiellement caractérisés par le génotype « simple mutant Leu352 » (**Tableau XXIV**).

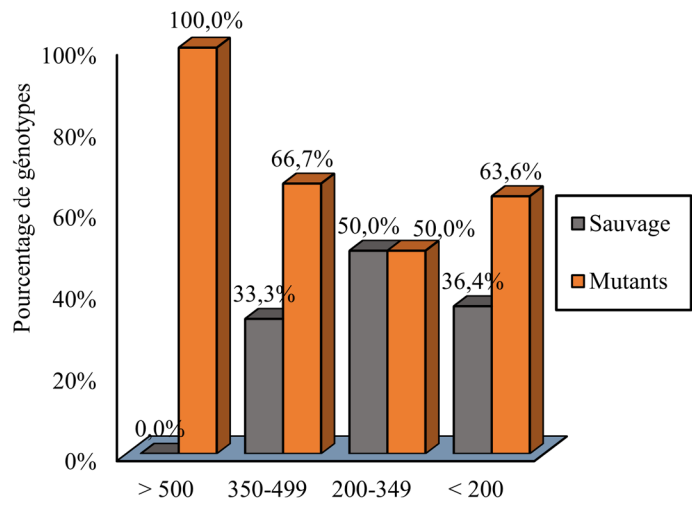
I.4.4.4. Distribution des différents types de polymorphisme mononucléotidique (SNP) selon le statut en 25 (OH) D₃ des échantillons de PVVIH

Les résultats ont montré que les fragments d'ADN analysés ont plus le polymorphisme du VDR combinant Fok-1+Bsm-1 (9/19) et le polymorphisme affectant Fok-1 (6/19) chez les PVVIH déficients en 25 (OH) D₃. Quant aux polymorphismes du VDR combinant Fok-1+Bsm-1+Apa-1 et le polymorphisme affectant Bsm-1, ils ont été les plus observés chez les PVVIH insuffisants en 25 (OH) D₃ (**Figure 32**).

Tableau XXII : Statut en vitamine D3 et prévalence du polymorphisme Bsm-1 (rs 1544410) selon le taux de CD4+ des échantillons de PVVIH déficients et insuffisants en 25 (OH) D₃

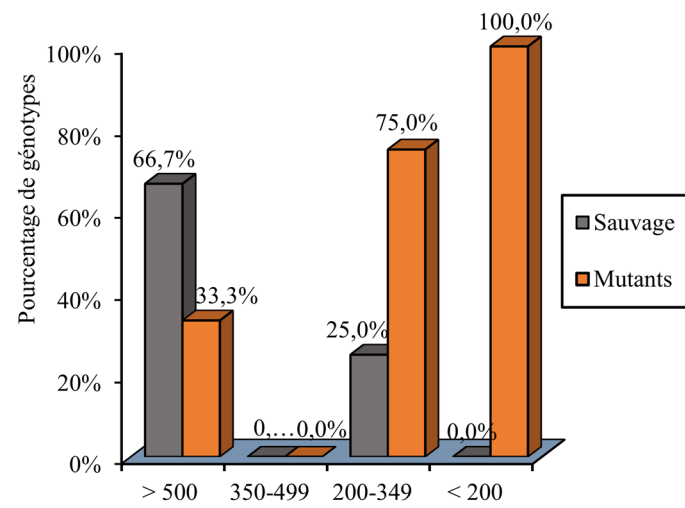
Tranches de CD4+ (Cell/mm ³)	Échantillons de PVVIH déficients en 25 (OH) D ₃ N=19								Échantillons de PVVIH insuffisants en 25 (OH) D ₃ N=13							
	Effectifs	GA	GG	AG	AC	AA	GC	P value	Effectifs	GA	GG	AG	AC	AA	GC	P value
> 500	1	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0(0)	0 (0)	0,3	3	2(66,7)	1(33,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,13
350-499	3	1 (33,3)	0 (0)	1(33,3)	0 (0)	0(0)	1(33,3)	0,6	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	-
200-349	4	2 (50)	1 (25)	1 (25)	0 (0)	0(0)	0 (0)	0,3	8	2 (25)	2 (25)	2(25)	1(12,5)	1(12,5)	0 (0)	0,7
< 200	11	4(36,4)	4(36,4)	2(18,2)	1(9,1)	0(0)	0 (0)	0,05	2	0 (0)	2 (100)	0(0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,03

génotype GA = sauvage, génotypes AG, AA, GC, AC et GG = mutants. Test du Chi-deux.



Tranches de lymphocytes T CD4+ (Cell/mm³)

PVVIH déficients en 25 (OH) D₃



Tranches de lymphocytes T CD4+ (Cell/mm³)

PVVIH insuffisants en 25 (OH) D₃

Figure 29 : Génotypes de Bsm-1 des échantillons de PVVIH selon le statut en 25 (OH) D₃ et le taux de CD4+

TABLEAU XXIII : Statut en vitamine D₃ et prévalence du polymorphisme Apa-1 (rs 7975232) selon le taux de CD4+ des échantillons de PVVIH déficients et insuffisants en 25 (OH) D₃

Tranches de CD4+	Échantillons de PVVIH déficients en 25 (OH) D ₃ N=19				Échantillons de PVVIH insuffisants en 25 (OH) D ₃ N=13			
	Effectifs	CA	AC	p value	Effectifs	CA	AC	p value
> 500	1	1 (100)	0 (0)	1	3	1 (33,3)	2 (66,7)	1
350-499	3	3 (100)	0 (0)	0,1	0	0 (0)	0 (0)	—
200-349	4	3 (75)	1 (25)	0,48	8	2 (25)	6 (75)	0,13
< 200	11	11 (100)	0 (0)	< 0,0001	2	2 (100)	0 (0)	0,32

génotype CA = sauvage, génotype AC = mutant. Test du Chi-deux.

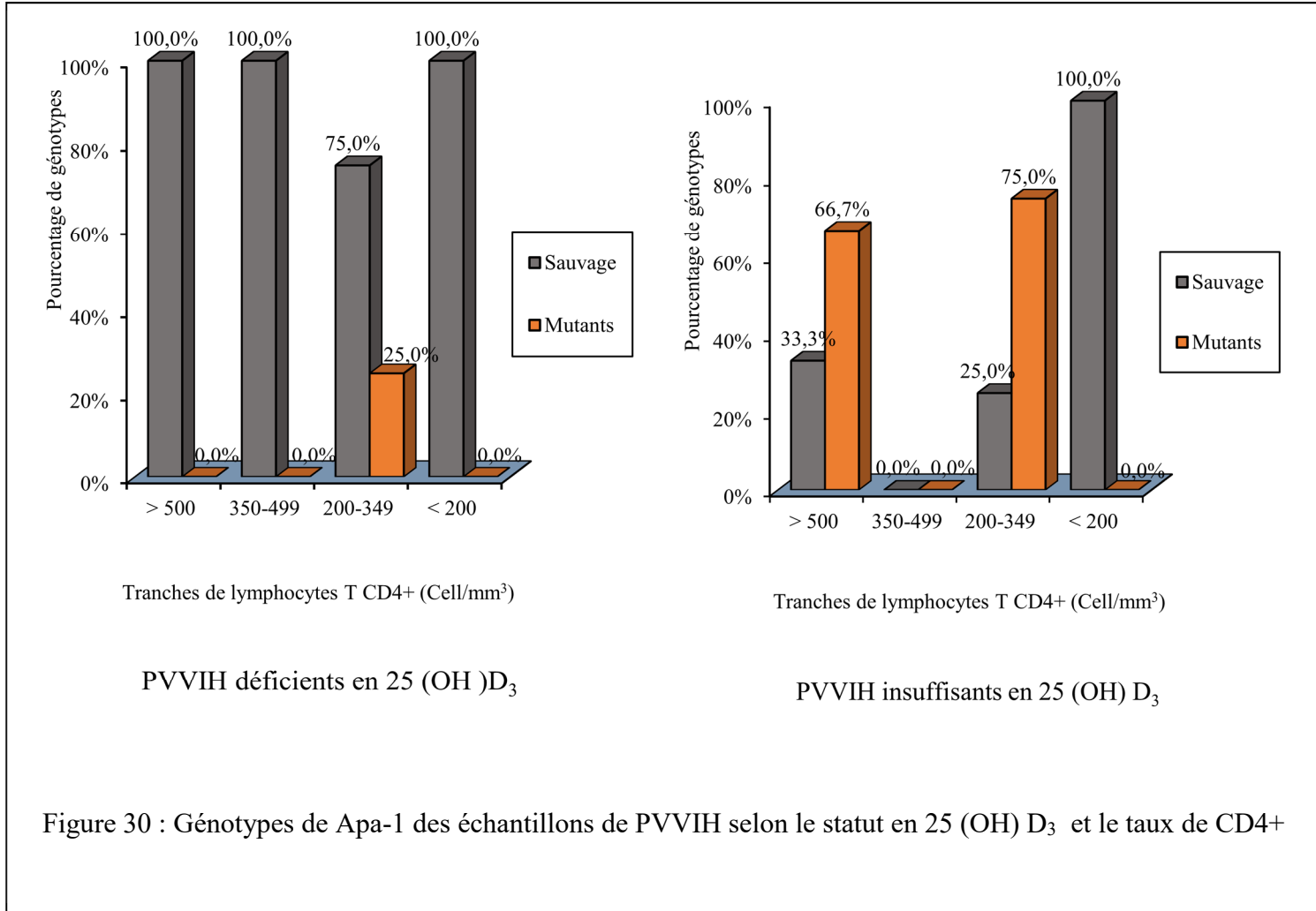
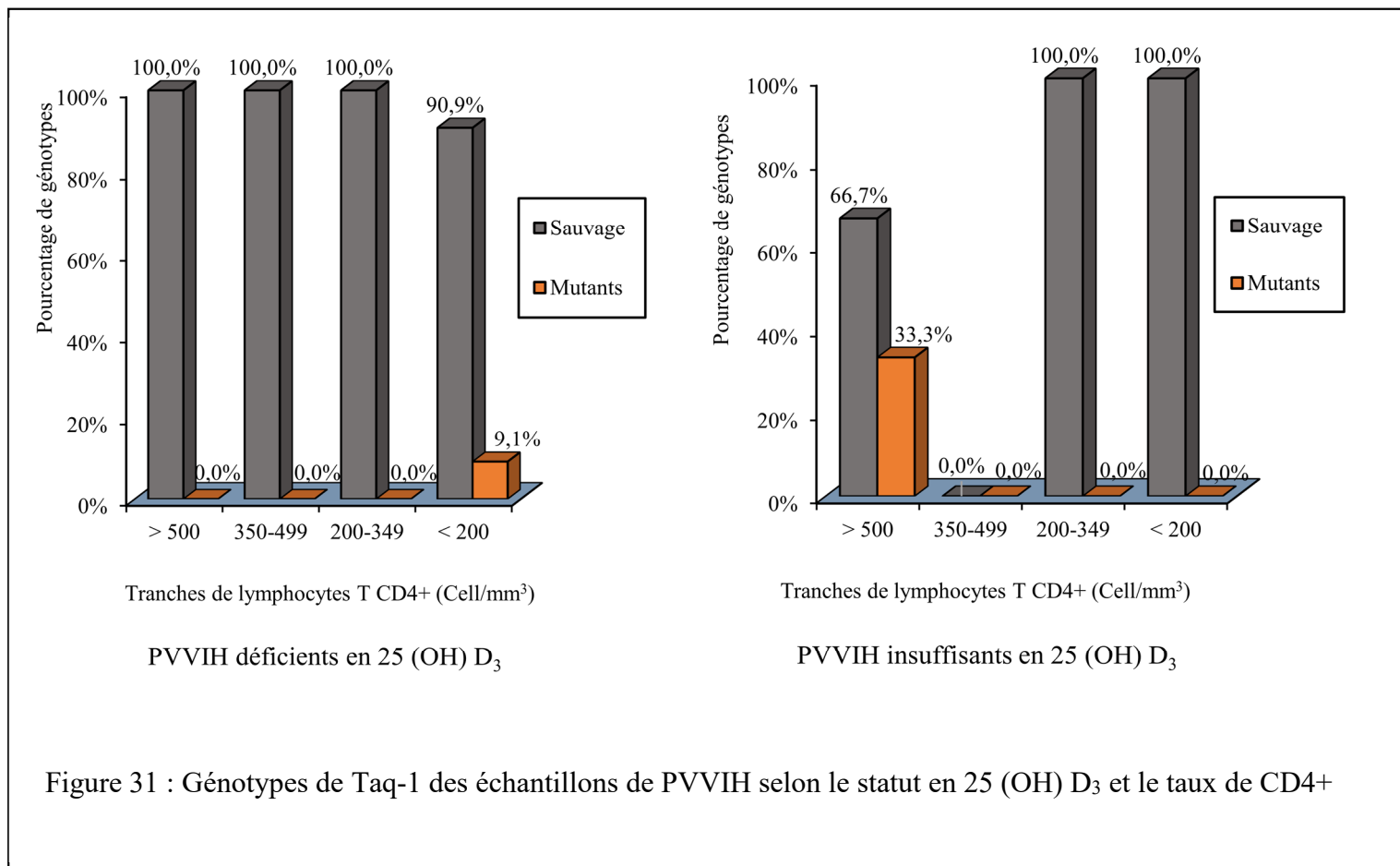


Figure 30 : Génotypes de Apa-1 des échantillons de PVVH selon le statut en 25 (OH) D₃ et le taux de CD4+

Tableau XXIV : Statut en vitamine D₃ prévalence du polymorphisme Taq-1 (rs 731236) selon le taux de CD4+ des échantillons de PVVIH déficients et insuffisants en 25 (OH) D₃

Tranches de CD4+	Échantillons de PVVIH déficients en 25 (OH) D ₃ N=19				Échantillons de PVVIH insuffisants en 25 (OH) D ₃ N=13			
	Effectifs	Sauvage Ile352	Simple Mutant Leu352	p value	Effectifs	Sauvage Ile352	Simple Mutant Leu352	p value
> 500	1	1 (100)	0 (0)	1	3	2 (66,7)	1 (33,3)	1
350-499	3	3 (100)	0 (0)	0,1	0	0 (0)	0 (0)	–
200-349	4	4 (100)	0 (0)	0,03	8	8 (100)	0 (0)	0,0004
< 200	11	10 (90,9)	1 (9,1)	0,0006	2	2 (100)	0 (0)	0,32

génotype Ile352 (isoleucine352), génotype Leu352 (leucine352) ;
Ile 352= (352) position du codon ATT traduit en Ile sur la protéine du VDR. Test du Chi-deux.



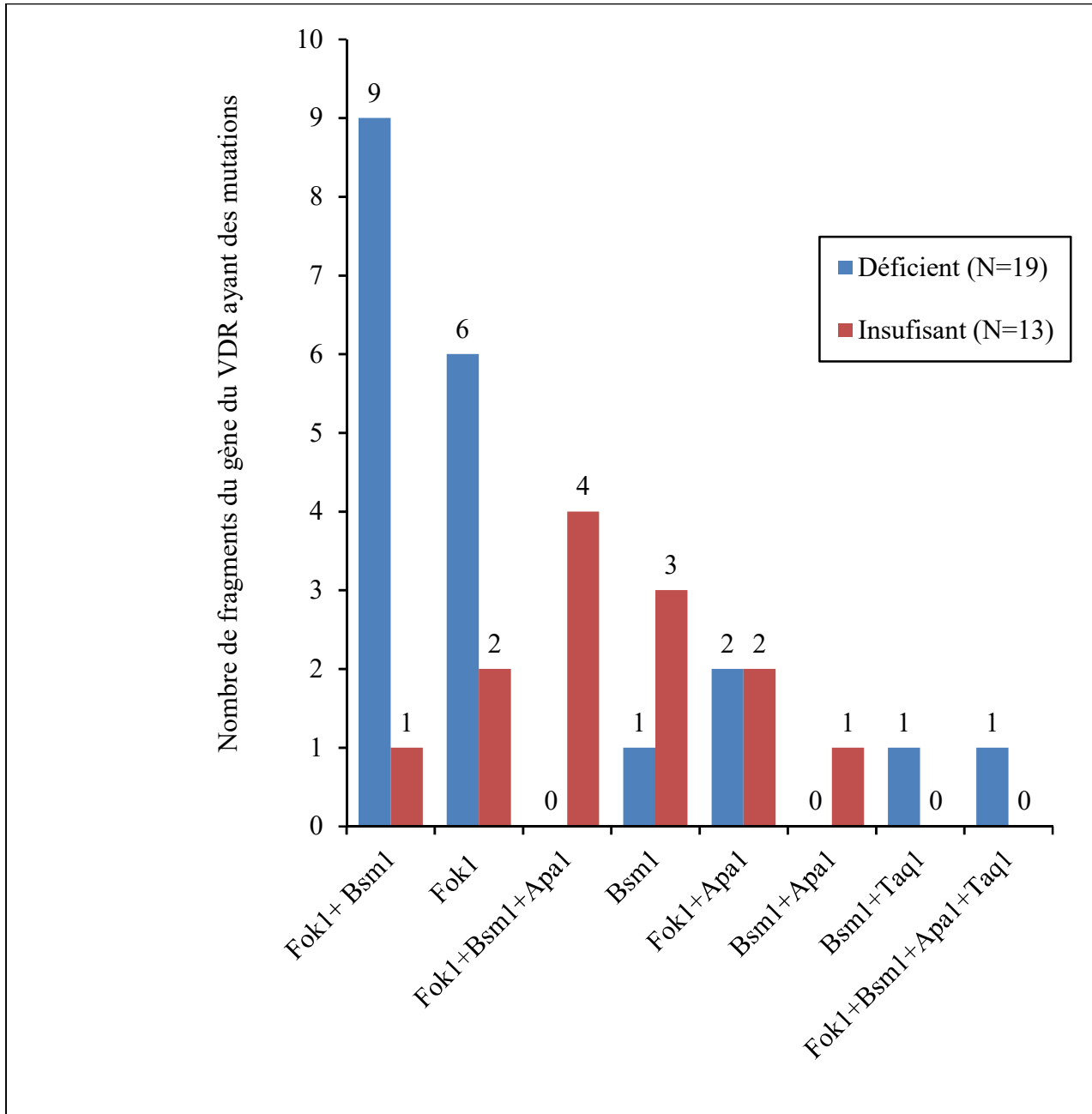


Figure 32 : Répartition des différents types de polymorphisme mononucléotidique (SNP) du gène du VDR des échantillons de PVVIH en fonction du statut 25 (OH) D₃

II. DISCUSSION

Les caractéristiques épidémiologiques de la population d'étude montrent pourquoi la lutte contre l'infection à VIH est une préoccupation majeure car elle affaiblit le développement socio-économique des pays en développement. En effet, dans cette étude, les moyennes d'âge sont de 39 ans pour des PVVIH traités et de 32 ans pour les PVVIH non traités. Ces résultats sont similaires à ceux de **Boyvin et al. (2013)** qui ont montré que la population atteinte par l'infection à VIH en Côte d'Ivoire est jeune, la plus active sexuellement et économiquement. Par ailleurs, plusieurs études dans le monde ont indiqué que la tranche d'âge la plus touchée est 24 à 49 ans (**ONUSIDA, 2017**) dans laquelle s'inscrivent les résultats obtenus dans cette étude ainsi que ceux trouvés par **Luis et al. (2002)** en Espagne (âge moyen de 37 ans). Une étude similaire en Ethiopie portant sur une population âgée de 18 à 60 ans a trouvé une moyenne d'âge de 36 ans (**Ademasu et al., 2014**).

Concernant le statut en 25-hydroxyvitamine D₃ et en parathormone, cette étude a montré que les niveaux de calcium sont normaux avec une hyperphosphatémie chez tous les sujets infectés par le VIH. Ceci confirme bien la perturbation du bilan phosphocalcique relevée par **Boyvin et al. (2017)**. Cette situation pourrait être due à un déficit en vitamine D (**Haug et al., 1998**) comme observé dans cette étude chez les PVVIH. De plus, les travaux de **Moges et al. (2014)** ont montré que l'hyperphosphatémie aurait pour origine une faible concentration sérique de l'hormone parathyroïdienne (PTH) et l'action inhibitrice du FGF-23 sur l' α -1-hydroxylase. De ce fait, il n'y aurait donc pas de réabsorption du phosphate dans le tubule proximal. L'hyperphosphatémie constatée chez certains PVVIH pourrait être due aussi au relargage du phosphore dans la circulation sanguine suite à la résorption osseuse. L'efflux accru de phosphate de l'os en raison d'une résorption osseuse induite par la PTH en excès peut également contribuer à l'augmentation des concentrations du phosphate sérique dans le cadre d'une hyperparathyroïdie sévère (**Indridason et Quarles, 2002**). Ainsi, il a été rapporté un effet direct du VIH sur les cellules ostéogéniques, une activation persistante des cytokines pro-inflammatoires, une régulation positive du TNF-alpha qui induit l'apoptose des ostéoblastes (**Brown et Qaqish, 2006**). De plus, bien que les patients infectés par le VIH dans cette étude aient des niveaux de créatinine sérique dans les limites normales, un dysfonctionnement rénal subclinique affectant l'hydroxylation ne peut être exclu (**Haug et al., 1998**). En effet, selon **Sai et al. (2011)** le métabolisme de la vitamine D₃ et celle de la parathormone sont liés. L'hydroxylation de la 25 (OH) D₃ en 1,25 (OH)₂ D₃ est étroitement régulée par la PTH, le calcium et le phosphore pour prévenir le développement de l'hypercalcémie. De plus, la réabsorption du calcium dans le rein est stimulée par la 1,25 (OH)₂ D₃ sous l'influence de la PTH (**Hileman et al., 2016**). Cependant, les concentrations moyennes de parathormone dans cette étude sont normales. Elles ne pourraient donc pas être mises en cause dans cette perturbation du bilan phosphocalcique.

Cette déficience en 25 (OH) D₃ a concerné 50 % des PVVIH traités et environ 12 % des PVVIH non traités. Ces résultats sont similaires à ceux d'**Ansemant et al. (2013)** qui ont montré une déficience en 25 (OH) D₃ chez 50 % de PVVIH traités. De même, il a été observé chez environ 12 % des témoins VIH négatif, une déficience en 25 (OH) D₃ et chez 44 % des témoins une insuffisance. L'hypovitaminose D est un trouble mondial, avec une prévalence élevée dans la population générale des pays en développement et occidentaux (**Arabi et al., 2010**). Au-delà des différences génétiques, raciales, géographiques et saisonnières, cette déficience serait due à une consommation insuffisante d'aliments contenant de la vitamine D comme, par exemple, le lait et les produits laitiers, le poisson, les œufs et le jus d'orange enrichi (**Holick, 2007**). Selon les études menées par **Mangin et al. (2014)**, même les personnes en bonne santé, exposées à une lumière du soleil adéquate, ne peuvent pas synthétiser suffisamment de vitamine D sans supplémentation. En effet, il a été démontré que des individus peuvent être déficients en vitamine D avec une exposition solaire importante si la zone cutanée exposée est limitée (**Hollis et al., 2007**). Dans un milieu urbain en Afrique avec une variabilité saisonnière des rayons ultraviolets B (UVB) et une forte prévalence des maladies infectieuses, il a été constaté que l'habitude d'exposition aux rayons UVB est le déterminant le plus important du statut de vitamine D chez les adultes en bonne santé avec une pigmentation modérée ou noire de la peau (**Coussens et al., 2015**).

De plus, une insuffisance en 25 (OH) D₃ (20 – 30 ng/mL) a été révélée chez 33,3 % des PVVIH traités et 41,9 % des PVVIH non traités. **Gichuhi et al., (2014)** ont aussi obtenu une insuffisance en 25 (OH) D₃ chez 32,78 % des PVVIH traités et chez 35,09 % des PVVIH non traités. En effet, en cas d'infection avancée par le VIH, une proinflammation est observée. Certaines cytokines (INF- γ , IL-4) qui sont alors sécrétées interagissent avec le cytochrome CYP27B1 qui est un catalyseur de la 1 α -hydroxylase rénale (**White, 2012**). Une explication est que l'activation immunitaire persistante suite à des niveaux élevés de facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α), bloque l'effet stimulant de la PTH sur la 1- α -hydroxylase rénale en réduisant le niveau de 1,25 (OH)₂ D₃ chez les patients infectés par le VIH (**Beard et al., 2011 ; Barbosa et al., 2014**). Une consommation accrue de vitamine D par les cellules du système immunitaire pour leurs renouvellements a été mise en évidence au cours de l'infection à VIH. Cette hormone est utilisée lors de la différenciation de ces cellules qui subissent un renouvellement plus important lors de l'infection par le VIH (**Holick, 2004**).

Cette étude a montré respectivement une insuffisance et une déficience en 25 (OH) D₃ chez les PVVIH traitées, de la tranche de lymphocytes T CD4⁺ de 350-499 cellules/mL et inférieur à 200 cellules/mL. Dans cette gamme de CD4⁺, l'apparition d'infections opportunistes augmente fortement la production de cytokines pro-inflammatoires, y compris le TNF- α , qui inhibe la 1-alpha-hydroxylase au niveau rénal, stoppant ainsi la transformation de la vitamine 25 (OH) D₃ en 1,25

(OH)₂ D₃ sa forme active (**White, 2012**). Mais les médicaments antirétroviraux, en particulier les IP et les INNTI, inhibent fortement les enzymes du cytochrome P450 et de la 25-alpha-hydroxylase et de la 1,25-alpha-hydroxylase (**Conesa-Botella et al., 2009**). La vitamine D possède une activité régulatrice de la défense immunitaire et la capacité de moduler la différenciation et la prolifération de certains types de cellules exprimant le récepteur de la vitamine D (VDR) (**Mansueto et al., 2015**).

Les patients non traités ont également une insuffisance en 25 (OH) D₃ dans la tranche de lymphocytes T CD4 + inférieure à 200 cellules/mm³. En général, dans cette tranche de lymphocytes T CD4+, les complications infectieuses dues à une faible immunité nécessitent des soins hospitaliers réduisant ainsi la durée d'exposition au soleil pour les patients. De plus, ces complications infectieuses et l'hospitalisation peuvent entraîner une malnutrition et une diminution de la consommation orale de certains aliments contenant de la vitamine D (**Mansueto et al., 2015**).

Ainsi, la déficience ou l'insuffisance de la vitamine D pourrait perturber la fonction et la réponse immunitaires. Elle pourrait précipiter la destruction des CD4 et la progression de la maladie (**Welz et al., 2010 ; Stein et al., 2011**). D'autres auteurs comme **Kim et al. (2011)** ont également trouvé une association positive entre la vitamine D et le nombre de CD4. De plus, le déficit en vitamine D₃ circulante pourrait s'expliquer par des variations au niveau du locus codant pour le récepteur de la vitamine D (VDR) au cours de l'infection à VIH (**Nieto et al., 2004**). Le dysfonctionnement du VDR lié à la carence en 25 (OH) D₃ (**Waterhouse et al., 2009**) est associé à la progression de l'infection à VIH (**Nieto et al., 2004 ; de la Torre et al., 2008**).

Dans cette étude, une hypoparathyroïdie (< 10 pg/mL) a été observée chez 10,0 %, soit 12/120 patients traités. Il est à noter qu'une diminution du taux de PTH a déjà été rapportée chez des patients infectés par le virus de l'immunodéficiência humaine (VIH) (**Jaeger et al., 1994 ; Cherqaoui et al., 2014**) dont le mécanisme pourrait être attribué aux cellules parathyroïdiennes. En effet, **Hellman et al. (1996)** ont montré la possibilité d'une inhibition fonctionnelle des cellules parathyroïdiennes par des anticorps anti-CD4 ou une infection directe par le VIH. Par ailleurs, le TNF- α semble nuire à l'effet de stimulation de la PTH par des mécanismes impliquant une régulation négative des récepteurs de la PTH, une altération de l'activité de la protéine kinase C et une inhibition de la réponse à l'AMPc après stimulation de la PTH (**Haug et al., 1998**).

Les résultats de cette étude ont aussi indiqué une hyperparathyroïdie chez 3,3 %, soit 4/120 des PVVIH traités contre 3,7 %, soit 6/163 des témoins VIH négatif. Des études ont montré que même une légère réduction du taux sérique de 25 (OH) D₃ peut être associée à une hyperparathyroïdie secondaire, à un renouvellement osseux accru et à une perte osseuse accélérée. Ceci augmente le risque de fractures osseuses (**Mezquita-Raya et al., 2001 ; Adams et Hewison, 2008**). Dans cette étude, le niveau de PTH est normal dans toutes les tranches de lymphocytes T CD4+ chez les patients

traités ou non. Bien qu'une forte teneur en PTH soit considérée comme la caractéristique de l'hypovitaminose D, une concentration "normale" de PTH peut être trouvée chez les sujets classés comme "déficients en vitamine D". Par conséquent, bien que de nombreux sujets ayant des taux sériques de 25 (OH) D₃ inférieurs au seuil puissent avoir une PTH dans la plage de référence « normale », ils peuvent avoir une « hyperparathyroïdie fonctionnelle » (**Souberbielle et al., 2003 ; Okazaki et al., 2011**). Ainsi, selon **Mori et al. (2015)**, l'hypovitaminose D peut être considérée comme un facteur de risque majeur pour la santé osseuse.

Dans le cas de l'analyse du statut en 25-hydroxyvitamine D₃ et parathormone de la population sous ARV selon l'âge, le taux de lymphocytes T CD4⁺ et le type de traitement antirétroviral de cette étude, 21 patients traités par la combinaison Zidovudine / Lamivudine / Efavirenz (AZT-3TC-EFV) ont une déficience en 25 (OH) D₃. Cependant, des niveaux suffisants de 25 (OH) D₃ ont été observés chez les patients traités par TDF-3TC-LPV/r. A la fois les inhibiteurs de la protéase (IP) et les inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) ont été associés à la perturbation des voies métaboliques de la vitamine D (**Theodorou et al., 2014 ; Wohl et al., 2014**). Les INNTI, en général, agissent sur la vitamine D à travers les cytochromes (CYP3A4) nécessaires au métabolisme de la vitamine D (**Conesa-Botella et al., 2010**). Ainsi, l'exposition à l'efavirenz (EFV) a été associée à une carence en 25 (OH) D₃ (**Allavena et al., 2012 ; Havers et al., 2014a**). L'efavirenz abaisse le niveau de 25 (OH) D₃ (**Biadgilign et al., 2012**) en induisant le catabolisme de la 25 (OH) D₃ par l'induction du cytochrome CYP24A, l'enzyme qui convertit la 25 (OH) D₃ en son métabolite inactif 24,25-dihydroxyvitamine D₃ (**Mansueto et al., 2015**). Contrairement aux INNTI, les Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse (INTI) ne sont pas métabolisés par les cytochromes (**Conesa-Botella et al., 2010**). Des études ont montré que la zidovudine est aussi associée à une carence en vitamine D (**Fox et al., 2011**). Cette carence en 25 (OH) D₃ a concerné les femmes traitées avec AZT-3TC-NVP. En revanche, celles qui ont été traitées par les combinaisons AZT-3TC-EFV, AZT-3TC-LPV/r ou TDF-3TC-EFV ont présenté une insuffisance en vitamine D. Les hommes sous AZT-3TC-EFV ou TDF-3TC-EFV ont été déficients en vitamine D. De même une insuffisance en vitamine D a été notée chez ceux qui sont sous AZT-3TC-NVP et AZT-3TC-LPV/r. Généralement, les femmes sont plus exposées au déficit en vitamine D que les hommes (**Holick, 2004**). Selon **Abbas, (2017)** cela peut s'expliquer par la capacité des tissus adipeux à stocker la vitamine D sous forme de 25 (OH) D₃, forme de réserve de la vitamine D chez la femme. Cependant, il a été démontré que l'infection par le VIH induit l'expression et la sécrétion d'IL-6 par les monocytes et les macrophages. Des études ont trouvé une corrélation positive entre l'indice de masse corporelle (IMC) et l'IL-6. L'effet de l'IMC sur l'IL-6 a été significativement influencé par le sexe, qui peut être attribué au dimorphisme sexuel dans la distribution des graisses corporelles en faveur de la femme

par rapport à l'homme. En effet, le tissu adipeux peut produire, dans certains cas, jusqu'à 25 % d'IL-6 circulante, cytokine proinflammatoire (**Borges et al., 2015**). Selon **Yilma et al. (2016)**, les patients qui sont sous les combinaisons trithérapeutiques AZT-3TC-NVP ou TDF-3TC-EFV ont un taux de 25 (OH) D₃ sérique plus bas après 3 mois de traitement comparé aux patients sous TDF- 3TC-NVP. Par ailleurs, tous les 11 patients sous TDF-3TC-LPV/r, quels que soit le sexe, l'âge et le taux de lymphocytes T CD4⁺, ont eu des niveaux normaux de 25 (OH) D₃ et de PTH. Ces résultats sont similaires à ceux de **Klassen et al. (2012)** qui ont trouvé chez les patients sous ténofovir (TDF) des taux normaux de 25 (OH) D₃ et de PTH. De plus, Il a été démontré que l'utilisation du TDF ou du ritonavir (r) est associée à des concentrations élevées de 25 (OH) D₃ (**Yin et Stein, 2011**). Aucun effet connu du ténofovir sur le métabolisme de la vitamine D n'a été rapporté. En outre, le ténofovir peut induire un dysfonctionnement du tubule proximal rénal qui pourrait réduire l'effet de la 1 α -hydroxylase dans le rein et conduire ainsi à l'accumulation de la vitamine D (**Rosenvinge et al., 2010**). Quant au ritonavir, il semblerait interférer avec le métabolisme de la vitamine D par inhibition de la 1 α - et 25 α -hydroxylation à la fois dans les hépatocytes et dans les monocytes en culture. Par conséquent, la réduction de la conversion de la 25 (OH) D₃ en son métabolite actif pourrait potentiellement expliquer l'augmentation de la 25 (OH) D₃ chez les sujets à faibles concentrations de 1,25 (OH)₂ D₃ (**Hamzah et al., 2016**). Cependant, la combinaison d'inhibiteurs de la protéase (IP) et de ténofovir engendre une dérégulation du métabolisme minéral, mais n'altère pas le niveau de 25 (OH) D₃ (**Yin et Stein, 2011**). Cette situation, selon **Yin et Stein, (2011)** serait associée à une phosphaturie / hypophosphatémie, et la 1,25 (OH)₂ D₃ est une hormone de régulation de l'hypophosphatémie ; ainsi, il est concevable qu'une inhibition de la production de la 1,25 (OH)₂ D₃ par les inhibiteurs de la protéase pourrait exacerber la dérégulation du métabolisme minéral chez les patients recevant du ténofovir. Dans cette étude, il a été constaté des concentrations normales de PTH quel que soient l'âge, le taux de lymphocytes T CD4⁺ et le type de traitement antirétroviral. Chez les patients sous TDF-3TC-LPV/r, la PTH produite a une concentration normale, donc favoriserait la conversion de la 25 (OH) D₃ en 1,25 (OH)₂ D₃, sa forme active. Toutefois, des déficits en PTH (hypoparathyroïdie) ont été relevés chez les individus âgés de 26 à 34 ans traités avec AZT-3TC-EFV ou avec TDF-3TC-EFV ayant des taux de lymphocytes T CD4⁺ entre 350 et 499 cell/mm³. Il en est de même pour ceux sous AZT-3TC-NVP quels que soient les tranches de lymphocytes T CD4⁺. Il est à noter qu'une diminution du taux de PTH a déjà été rapportée chez des patients infectés par le VIH (**Cherqaoui et al., 2014**) dont le mécanisme a été montré par **Hellman et al. (1996)** à l'aide d'anti-Leu3a, un anticorps monoclonal reconnaissant le CD4. De plus, le TNF- α semble nuire à l'effet de stimulation de la PTH par des mécanismes impliquant une régulation négative des récepteurs de

la PTH, une altération de l'activité de la protéine kinase C et une inhibition de la réponse à l'AMPc après stimulation de la PTH (**Haug et al., 1998**).

Par ailleurs, une déficience en 25 (OH) D₃ a été indiquée chez les patients traités avec AZT-3TC-NVP âgés de 18 à 25 ans et chez ceux ayant un taux de lymphocytes T CD4+ supérieur à 500 cell/mm³. Cette tranche d'âge serait particulièrement à risque, car en Afrique du Sud, des déficits en 25 (OH) D₃ ont été rapportés chez des patients âgés de 15 à 29 ans traités avec AZT-3TC-NVP, plus spécifiquement chez des femmes âgées de 15 à 24 ans et chez des hommes âgés de 20 à 29 ans (**Abdool et al., 1992**). Aussi, une déficience en 25 (OH) D₃ a-t-elle été observée chez ceux âgés de 35-49 ans traités, par AZT-3TC-EFV d'une part, et traités par AZT-3TC-NVP d'autres part, tous ayant un taux de lymphocytes T CD4+ inférieur à 200 cell/mm³. Cette carence en vitamine D observée dans cette étude pourrait-elle être due à la malnutrition et la diminution de l'absorption d'aliments contenant de la vitamine D (**Mansueto et al., 2015**).

Pour ce qui est de l'étude des polymorphismes du gène du récepteur de la vitamine D des échantillons d'étude, la distribution allélique et génotypique du gène du récepteur de la vitamine D a révélé plusieurs polymorphismes dont Fok-1, Bsm-1, Apa-1 et Taq-1. En effet, plus de 470 polymorphismes du gène VDR ont été rapportés. Cependant les fragments les plus étudiés sont Fok-1 (rs 2228570) dans l'exon 2, Bsm-1 (rs1544410) et Apa-1 (rs7975232) de l'intron 8 et Taq-1 (rs731236) de l'exon 9 (**Ashktorab et al., 2011**).

Dans cette étude, l'analyse du polymorphisme de Fok-1 a confirmé la présence des deux codons d'initiation (ATG) aux sites g.30920 T et g.30929 T. Cependant, des allèles mutants C au premier site g.30920 C et au second site g.30929 C d'initiation ont été mis en évidence. L'allèle mutant C de Fok-1 a été le plus fréquent.

Ce polymorphisme a lieu près de la région 5'-UTR du gène dans le domaine de liaison à l'ADN et joue un rôle essentiel dans la stabilité du message et dans les processus post-transcriptionnels (**O'Neill et al., 2013 ; Neela et al., 2015**). En effet, il produit une protéine VDR raccourcie de 3 acides aminés (**Miyamoto et al., 1997**) et plus efficace dans la transactivation du gène cible régulant la vitamine D (**Mahmoud et Ali, 2014**). La prévalence élevée du génotype « simple mutant » **Thr1Met4** aussi bien chez les PVVIH (62,5 %) que chez les témoins VIH négatif (55,6 %) sans différence significative ($p = 0,86$) montre que plus de la moitié de la population d'étude a en commun une protéine VDR avec une plus grande activation transcriptionnelle du gène cible. De plus, cette simple mutation n'est pas liée à l'infection à VIH. Cependant, **Nieto et al. (2004)** ont montré que ce polymorphisme a été associé avec une progression rapide de l'infection à VIH. Par ailleurs, l'allèle C a été associé à de faibles niveaux sériques de la 25 (OH) D₃ (**McGrath et al., 2010**). Aussi, **Suneetha et al. (2006)** ont-ils rapporté une association entre les polymorphismes de Bsm-1, Apa-1 et

Taq-1, et la stabilité de l'ARN messager (ARNm) du VDR. En effet, les polymorphismes dans l'intron 8 et l'exon 9 du VDR contrôlent directement l'expression de sa protéine (**Larcombe *et al.*, 2008**). Les polymorphismes du gène du VDR ont une signification fonctionnelle pour la stabilité de l'ARNm et l'efficacité de la traduction des protéines. De ce fait, ils seraient responsables du taux réduit de la protéine VDR (**Uitterlinden *et al.*, 2004a**).

Le polymorphisme de Bsm-1 est localisé dans la région 3' non-transcrite du VDR. Il n'affecterait pas la séquence des acides aminés du VDR et interviendrait dans la régulation de la stabilité de l'ARN messager du VDR (**Zhang *et al.*, 2018**). Dans cette étude, la prévalence de l'allèle mutant **A** (g.63510 **A**) de Bsm-1 était plus faible (28 %) chez les PVVIH que chez les témoins VIH négatif (67 %). Celle du génotype mutant **GG** était de 34,4 % chez les PVVIH et de 5,6 % chez les témoins VIH négatif avec une différence significative ($p = 0,05$). Ces résultats sont similaires à ceux de **De la Torre *et al.* (2008)** et de **Alagarasu *et al.* (2009)** qui ont montré que le polymorphisme de Bsm-1 a été associé à une augmentation de la susceptibilité à l'infection à VIH et à un taux élevé de progression de l'infection à VIH chez des adultes caucasiens.

Quant au polymorphisme Apa-1, il a montré deux types d'allèles mutants **A** (g.65023 **A**) et **C** (g.65024 **C**) chez 28,1 %, soit 9/32 d'infectés VIH contre 0 % soit 0/18 chez les témoins. Le génotype mutant **AC** a été le plus fréquent chez les infectés VIH. L'étude d'une population africaine infectée ou non par le VIH a montré des différences dans le polymorphisme du fragment Apa-1 (**McNamara *et al.*, 2016**). De plus, la prévalence de l'allèle **A** est de 29 % parmi les asiatiques, de 53 % parmi les blancs et de 67 % parmi les américano-africains (**Zmuda *et al.*, 2000**). La prévalence obtenue chez les patients VIH de cette étude est de 28,1 %.

Les positions Bsm-1 et Apa-1 sont situées dans la région 3' du gène du VDR avec un fort déséquilibre de liaison. Leurs polymorphismes sont considérés comme des polymorphismes mononucléotidiques silencieux (SNPs). Par conséquent, ils ne modifient pas la séquence des acides aminés codants comme les polymorphismes du fragment Fok-1. Les polymorphismes de Bsm-1 et d'Apa-1 auraient tous les deux des influences sur la stabilité de l'ARNm. Cependant, des polymorphismes différents de Bsm-1 et d'Apa-1 pourraient conduire à différentes fonctions biologiques du VDR (**Zhang *et al.*, 2018**) tout comme les polymorphismes du fragment Taq-1 (**Khan *et al.*, 2014**).

À la différence du polymorphisme du fragment Bsm-1, il a été prouvé que le polymorphisme du fragment Taq-1 affecte la stabilité de l'ARNm, entraînant une altération des taux de protéines et des fonctions biologiques de la vitamine D (**Zhang *et al.*, 2018**). Dans cette étude, aucune différence significative n'a été observée entre les prévalences des allèles sauvages **T** (g.65058 **T**) et mutants **C** ou **A** (g.65058 **C** ou **A**) des deux sites de mutations de Taq-1 (rs 731236) entre les infectés VIH et les

témoins VIH négatif. Il en est de même pour les prévalences génotypiques « sauvages » Isoleucine entre les infectés VIH (93,7 %) et les témoins VIH négatif (83,3 %). Ce polymorphisme de Taq-1 est localisé dans la région 3' non traduite impliquée dans la régulation de l'expression génique, notamment par régulation de la stabilité de l'ARNm du VDR, affectant ainsi les taux circulants de 25-hydroxyvitamine D (Cao *et al.*, 2015). Selon des études, les prévalences des différents génotypes Taq-1 varient considérablement selon les différentes populations, probablement en raison de processus évolutifs différents. Il a été également démontré que le génotype TT est associé à de faibles taux circulants de vitamine D (Köstner *et al.*, 2009).

Dans cette étude, la combinaison Fok-1+Bsm-1 a été la plus observée avec 31 %, soit 10/32 des PVVIH et 56 %, soit 10/18 des témoins. Les polymorphismes Bsm-1 et Fok-1 ont été décrits comme étant associés aux concentrations de la 25 (OH) D₃ et également à l'activité du VDR (Filus *et al.*, 2008 ; Egan *et al.*, 2010). Ces polymorphismes du VDR varient en fonction des populations et pourraient expliquer pourquoi certaines populations sont plus à risque de déficit en vitamine D ou de pathologies dépendantes de la vitamine D, que d'autres. De même, une différence de fréquence de certains polymorphismes du VDR a été mise en évidence chez les caucasiens, les afro-américains et les asiatiques (Hustmyer *et al.*, 1993).

La distribution allélique et génotypique du gène du récepteur de la vitamine D pourrait influencer le statut en 25-hydroxyvitamine D₃ et le taux de CD4+ dans notre étude. En effet, les facteurs qui altèrent la disponibilité ou la fonction de la vitamine D biologiquement active sont importants pour la détermination de la susceptibilité à l'infection à VIH et dans la prédiction du taux de progression vers le stade avancé de la maladie (Moodley *et al.*, 2013). Une étude a établi le rôle des variantes génétiques du VDR dans la régulation des niveaux de 25 (OH) D₃ circulants (Wang *et al.*, 2010). Différents SNP influencent le statut en vitamine D₃, ils peuvent concerner les gènes codant pour les enzymes intervenant soit dans la synthèse, soit dans le catabolisme de la 25 (OH) D₃ et de la 1,25 (OH)₂ D₃, et peuvent ainsi influencer les concentrations sériques de la vitamine D₃ (Köstner *et al.*, 2009). Les fragments du gène du VDR, les plus étudiés sont Fok-1 (rs2228570) dans l'exon 2, Bsm-1 (rs1544410) et Apa-1 (rs7975232) dans l'intron 8 et Taq-1 (rs731236) dans l'exon 9 (Ashktorab *et al.*, 2011).

Dans cette étude, des prévalences significativement élevées de l'allèle mutant C (g.30920 T>C) ont été observées au niveau des fragments issus des PVVIH et des témoins. Ce polymorphisme a lieu près de la région 5'-UTR du gène dans le domaine de liaison à l'ADN et joue un rôle essentiel dans la stabilité du message et dans les processus post-transcriptionnels (Neela *et al.*, 2015). En effet, le polymorphisme Fok-1 (T → C) du VDR altère le site du codon d'initiation de la traduction du gène du VDR et se traduit par un VDR plus court qui aurait une activité transcriptionnelle accrue (van

Etten *et al.*, 2007). Lorsque la 1,25 (OH)₂ D₃ biologiquement active se lie au VDR, le complexe vitamine D / VDR agit comme un facteur de transcription qui interagit directement avec les régions promotrices des gènes cibles sensibles à la 1,25 (OH)₂ D₃ (**Carlberg et Polly, 1998 ; Adams et Hewison, 2008**).

Suneetha *et al.* (2006) ont rapporté une association entre les polymorphismes de Bsm-1, Apa-1 et Taq-1, et la stabilité de l'ARN messenger du VDR (ARNm). En effet, les polymorphismes dans l'intron 8 et l'exon 9 du VDR contrôlent directement l'expression de sa protéine (**Larcombe *et al.*, 2008**). Dans cette étude, les allèles mutants **A** (g.63510 **A**) et **C** (g.63905 **C**) ont été plus observés dans le fragment Bsm-1 issu des témoins (respectivement 66,7 et 22,2 %). Cependant, l'allèle mutant **G** (g.63905 **G**) a été plus retrouvé dans le fragment Bsm-1 provenant des trois groupes d'individus étudiés. Par contre, le fragment Apa-1 issu des PVVIH insuffisants en 25 (OH) D₃ est caractérisé par des fréquences élevées des allèles mutants **A** (g.65023 **A**) et **C** (g.65024 **C**), et du génotype mutant **AC**. Les polymorphismes de Bsm-1 et d'Apa-1 auraient tous les deux des influences sur la stabilité de l'ARN messenger. Cependant, des polymorphismes différents de Bsm-1 et d'Apa-1 pourraient conduire à différentes fonctions biologiques du VDR (**Zhang *et al.*, 2018**) tout comme les polymorphismes du fragment Taq-1 (**Khan *et al.*, 2014**).

Le polymorphisme du fragment Taq-1 affecte la stabilité de l'ARNm en entraînant une altération des fonctions biologiques de la vitamine D (**Zhang *et al.*, 2018**). Dans cette étude, il n'y avait pas de différence significative entre les fréquences des allèles sauvages T (g.65058 T) et mutants C ou A (g.65058 C ou A) de Taq-1 (rs 731236) entre les fragments d'ADN des infectés VIH et des témoins VIH négatif. Il en est de même pour les fréquences génotypiques « sauvages » Ile352 entre les infectés VIH (93,7 %) et les témoins VIH négatif (83,3 %). Ce polymorphisme de Taq-1 est localisé dans la région 3' non traduite impliquée dans la régulation de l'expression génique, notamment par régulation de la stabilité de l'ARNm du VDR, affectant ainsi les taux circulants de 25-hydroxyvitamine D₃ (**Cao *et al.*, 2015**). Selon **Köstner *et al.* (2009)** les fréquences des différents génotypes Taq-1 varient considérablement selon les différentes populations, probablement en raison de processus évolutifs différents.

En cas d'infection à VIH, un climat proinflammatoire entretenu par certaines cytokines (INF- γ , IL-4) est observé (**White, 2012**). Ce climat serait un véritable consommateur de vitamine D, hormone utilisée dans la différenciation des cellules du système immunitaire qui subissent un renouvellement plus important lors de l'infection par le VIH (**Holick, 2004**). Des études ont montré que le polymorphisme Fok-1-VDR affecte le comportement des cellules immunitaires, avec un système immunitaire plus actif pour la forme courte F-VDR, jouant ainsi probablement un rôle dans les maladies à médiation immunitaire (**Etten *et al.*, 2007**). Dans cette étude, le génotype mutant était

plus rencontré dans le fragment Fok-1 provenant des PVVIH déficients en 25 (OH) D₃ ayant les taux de CD4⁺ en-dessous de 500 cell/mm³ et dans celui provenant des PVVIH insuffisants en 25 (OH) D₃ ayant des taux de CD4⁺ au-dessus de 500 cell/mm³ et en-dessous de 350 cell/mm³. Ce fragment était essentiellement caractérisé par le génotype « simple mutant **Thr1Met4** ». Le polymorphisme du fragment Fok-1 a été associé avec une progression rapide de l'infection à VIH (**Nieto et al., 2004**). En effet, des auteurs ont trouvé une association positive entre la vitamine D et le nombre de CD4 (**Ross et al., 2011 ; Kim et al., 2011**). Ainsi, la déficience ou l'insuffisance de la vitamine D pourrait perturber la fonction et la réponse immunitaires. Elles pourraient précipiter donc la destruction des CD4 et la progression de la maladie (**Welz et al., 2010 ; Stein et al., 2011**) chez les PVVIH possédant le polymorphisme Fok-1 du gène du VDR. Les fragments issus de ces PVVIH, était essentiellement caractérisé par le génotype « simple mutant **Thr1Met4** ». De même, l'impact des variantes débilitantes sur la fonction VDR pourrait être exacerbé par une carence en vitamine D. Car Fok-1 est un SNP de région codante qui affecterait la fonction des protéines, contrairement aux SNP de région régulatrice du gène. Cette constatation concorde avec le caractère fonctionnel et codant du fragment Fok-1 (**O'Neill et al., 2013**).

En fait, les polymorphismes génétiques du VDR pourraient constituer un facteur important de susceptibilité individuelle aux effets biologiques de la vitamine D₃ (**Uitterlinden et al., 2004b**). Chez les PVVIH, le mécanisme exact par lequel l'allèle Bsm-1 G confère une protection et l'allèle Bsm-1 à augmenter le risque de progression de la maladie, n'est pas bien compris (**de la Torre et al., 2008 ; Alagarasu et al., 2009**). En effet, le polymorphisme 1544410_GG (génotype sauvage) a été associé à des taux de progression retardée vers le stade sida et à une résistance à l'infection par le VIH-1. Certains auteurs ont trouvé une association entre le polymorphisme rs1544410_AA (génotype mutant) avec la progression vers le stade sida (**Torres et al., 2010**). De plus, la fréquence du génotype mutant GG est plus rencontrée dans le fragment Bsm-1 provenant des PVVIH déficients en 25 (OH) D₃ quel que soit la tranche de CD4⁺ et dans celui provenant des PVVIH insuffisants en 25 (OH) D₃ ayant des taux de CD4⁺ au-dessus de 500 cell/mm³ et en-dessous de 350 cell/mm³. Le récepteur nucléaire de la vitamine D (VDR) intervient dans les effets immuno-modulateurs de la vitamine D₃. Le polymorphisme Bsm-1 G → A a été associé à une susceptibilité accrue à l'infection par le VIH et à un risque plus élevé de progression rapide de la maladie chez des adultes caucasiens (**de la Torre et al., 2008 ; Alagarasu et al., 2009**). De plus, le fragment Bsm-1 est en fort déséquilibre de liaison avec d'autres polymorphismes 3'UTR (Apa-1, Taq-1) qui ont également été associés à la progression de l'infection à VIH (**Alagarasu et al., 2009**). Dans cette étude, le fragment Apa-1 issu des PVVIH insuffisants en 25 (OH) D₃ a été caractérisé par une fréquence élevée des allèles mutants A (g.65023 A) et C (g.65024 C). Il en est de même pour le génotype mutant AC dans le fragment Apa-1 provenant

des PVVIH insuffisants en 25 (OH) D₃ ayant des taux de CD4⁺ au-dessus de 500 cell/mm³ (66,7 %) et compris entre 200-349 cell/mm³ (75 %). La prévalence du génotype mutant a été plus élevée dans les fragments Taq-1 provenant des PVVIH déficients en 25 (OH) D₃ ayant les taux de CD4⁺ compris en-dessus de 200 cell/mm³ (9,1 %) et dans le fragment Taq-1 provenant du PVVIH insuffisant en 25 (OH) D₃ ayant le taux de CD4⁺ au-dessus de 500 cell/mm³ (33,3 %). Ces fragments étaient essentiellement caractérisés par le génotype « simple mutant Leu352 ». L'effet du polymorphisme dépend de sa localisation dans le gène du VDR. Les polymorphismes (Bsm-1, Apa-1 et Taq-1) dans la région régulatrice du gène VDR sont impliqués dans la régulation du gène du VDR et la stabilité de l'ARNm (**Richetta et al., 2014**). Ils peuvent affecter le niveau d'ARNm / protéine VDR, la stabilité, l'efficacité de la traduction et les interactions protéine-protéine (**Whitfield et al., 2001**). Ces polymorphismes du gène du VDR influencent la liaison du 1,25 (OH)₂ D₃ au VDR, qui affecte les voies de signalisation médiées par le récepteur nucléaire de la vitamine D (**Bai et al., 2009**). Ces polymorphismes du gène du VDR ont une signification fonctionnelle pour la stabilité de l'ARNm et l'efficacité de la traduction des protéines. De ce fait, ils seraient responsables du taux réduit de la protéine VDR (**Uitterlinden et al., 2004a**), occasionnant ainsi de nombreuses perturbations. En effet, des génotypes spécifiques de Bsm-1, Apa-1 et de Taq-1 seraient reliés à une diminution de la densité minérale osseuse et à un risque élevé de fracture (**Gong et al., 1999 ; Thakkestian et al., 2004 ; Ji et al., 2010**).

Par ailleurs, les fragments d'ADN analysés ont plus montré des polymorphismes du VDR combinant Fok-1+Bsm-1 (9/19) et le polymorphisme affectant Fok-1 (6/19) chez les PVVIH déficients en 25 (OH) D₃. En revanche, chez les PVVIH insuffisants en 25 (OH) D₃, les polymorphismes du VDR combinant Fok-1+Bsm-1+Apa-1 et le polymorphisme affectant Bsm-1 ont été les plus observés. Ces polymorphismes du gène VDR pourraient être un facteur important de susceptibilité génétique à la diminution du niveau de 25 (OH) D₃ (**Younus et al., 2017**). Ainsi, une diminution de la vitamine D et son association avec les polymorphismes du gène VDR peuvent être utiles pour identifier les individus de groupe à haut risque (**Joshi et al., 2014**).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude suggère que les patients infectés par le VIH, et sous traitement antirétroviral constituent une population à haut risque de déficience ou d'insuffisance en vitamine D avec des concentrations moyennes de parathormone normales. Cependant des niveaux suffisants de 25 (OH) D₃ ont été observés chez les patients traités par TDF-3TC-LPV/r. Par ailleurs, le déficit en 25 (OH) D₃ est plus fréquent chez les patients traités, surtout ceux âgés de 35 à 49 ans ayant des taux de CD4+ inférieurs à 200 cellules/mm³ sous AZT-3TC-EFV ou AZT-3TC-NVP et chez les patients traités avec AZT-3TC-NVP âgés de 18 à 25 ans ayant un taux de lymphocytes T CD4+ supérieur à 500 cell/mm³. Cette perturbation de la concentration sérique de 25 (OH) D₃ pourrait être due à la durée d'exposition au soleil, à un apport nutritionnel insuffisant en aliment riches en vitamine D, au traitement antirétroviral administré aux patients infectés par le VIH et non à un défaut lié à la parathormone. Le déficit en 25 (OH) D₃ pourrait aussi être dû au dysfonctionnement du VDR.

L'étude du gène du récepteur de la vitamine D₃ (VDR) a montré que les polymorphismes Fok-1, Bsm-1 et Apa-1 affectent majoritairement les fragments d'ADN des infectés par le VIH. Les polymorphismes Fok-1, Bsm-1 et Apa-1 ont été décrits comme étant associés aux concentrations de la 25 (OH) D₃ et également à l'activité du VDR. Ces polymorphismes du gène du VDR ont une signification fonctionnelle pour la stabilité de l'ARNm et l'efficacité de la traduction des protéines.

Par conséquent, le dosage systématique de la vitamine D et de la PTH en tenant compte du stade clinique permettrait de détecter les patients à risque de carence en 25 (OH) D₃ au cours de l'infection à VIH. L'étude des polymorphismes du gène du VDR pourrait expliquer pourquoi cette carence est plus fréquente chez certains patients VIH positif.

En perspective, il serait souhaitable de mener d'autres études afin de:

- 1) Explorer le domaine de liaison à l'ADN et le Domaine de fixation du ligand du gène du VDR des fragments d'ADN des PVVIH déficients en 25 (OH) D₃ ayant le génotype « double mutant » **Thr1Thr4** et évaluer les cytokines antiinflammatoires.
- 2) Evaluer la supplémentation en vitamine D des PVVIH insuffisants et déficients en 25 (OH) D₃ en tenant compte des tranches d'âges de ceux sous chaque combinaisons thérapeutiques et l'influence des polymorphismes des gènes codant pour le VDR et les protéines intervenant dans le métabolisme de la vitamine D sur un échantillonnage plus grand.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbas M. A., 2017.** - Physiological functions of Vitamin D in adipose tissue. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **165** : 369-381.
- Abdool K. Q, Abdool K. S. S., Singh B., Short R. & Ngxongo S., 1992.** - Seroprevalence of HIV infection in rural South Africa. *AIDS*, **6** : 1535-1539.
- Abidi S. L. & Mounts T. L., 1997.** - Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separations of tocopherols. *Journal of Chromatography A*, **782** : 25-32.
- Adams J. S. & Hewison M., 2008.** - Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. *Nature clinical practice. Endocrinology & metabolism*, **4** : 80-90.
- Ademasu A., Kerisew B., Nibret E., Munshea A. & Adal M., 2014.** - Serum Zinc Deficiency and Associated Factors among Pre-ART and on-ART Adults at Felege Hiwot Referral Hospital, Bahir Dar, Northwest Ethiopia. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, **3** : 311-317.
- Adorini L., 2005.** - Intervention in autoimmunity: The potential of vitamin D receptor agonists. *Cellular Immunology*, **233** : 115-124.
- Agunwa C. C., Nnebue C. C., Duru C. B., Aniebue P. N., Aniebue U. U. & Ifeadike C. O., 2015.** - Knowledge of Obstetric Danger Signs Among Women of Reproductive Age in Rural Communities in Enugu State, Nigeria. *American Journal of Health Research*, **3** : 376-380.
- Ahmad R. & Hammond J. M., 2004.** - Primary, secondary and tertiary hyperparathyroidism. *Otolaryngologic Clinics of North America*, **37** : 701-713.
- Aké M., Poby A. G., Malan K. A., Tebi A. & Monnet D., 2001.** - Effets de la supplémentation en vitamine A sur les marqueurs de la nutrition dans la prise en charge de la malnutrition de l'enfant. *Annales de Biologie Clinique*, **59** : 417-21.
- Alagarasu K., Selvaraj P., Swaminathan S., Narendran G. & Narayanan P. R., 2009.** - 5' regulatory and 3' untranslated region polymorphisms of vitamin D receptor gene in south Indian HIV and HIV-TB patients. *Journal of Clinical Immunology*, **29** : 196-204.
- Allavena C., Delpierre C., Cuzin L., Rey D., Viget N., Bernard J., Guillot P., Duvivier C., Billaud E. & Raffi F., 2012.** - High frequency of vitamin D deficiency in HIV-infected patients: effects of HIV-related factors and antiretroviral drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **67** : 2222-2230.

Amadou A., Kouka N., Mahamane E. A. & Chanteau S., 2005. - Evaluation de cinq tests rapides et de deux algorithmes pour le diagnostic de l'infection par le VIH au Niger. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **98** : 5-8.

Anonyme 1, 2012. - INS & ICF International : Enquête Démographique et de Santé et à Indicateurs Multiples de Côte d'Ivoire 2011-2012. Calverton, Maryland, USA. 591 p. (Consulté le 13/04/2016).

Anonyme 2, 2015. - Directives nationales 2015 de Prise En Charge des Personnes Vivant avec le VIH en Côte d'Ivoire. Programme National de Lutte contre le Sida (PNLS), Côte d'Ivoire. 33p. (Consulté le 10/06/2016).

Ansemant T., Mahy S., Piroth C., Ornetti P., Ewing S., Guillard J-Cl., Croisier D., Duvillard L., Chavanet P., Maillefert J-F. & Piroth L., 2013. - Severe hypovitaminosis D correlates with increased inflammatory markers in HIV infected patients. *BMC Infectious Diseases*, **13** : 1-7.

Arabi A., El Rassi R. & El-Hajj F. G., 2010. - Hypovitaminosis D in developing countries- prevalence, risk factors and outcomes. *Nature Reviews Endocrinology*, **6** : 550-561.

Armas L. A., Hollis B. W. & Heaney R. P., 2004. - Vitamin D2 is much less effective than vitamin D3 in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **89** : 5387-5391.

Armbrecht H. J., Hodam T. L. & Boltz M. A., 2003. - Hormonal regulation of 25- hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase and 24-hydroxylase gene transcription in opossum kidney cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **409** : 298-304.

Ashktorab H., Nguza B., Fatemi M., Nouraie M., Smoot D.T., Schäffer A. A., Kupfer S. S., Camargo Jr C. A. & Brim H., 2011. - Case-control study of vitamin D, dickkopf homolog 1 (DKK1) gene methylation, VDR gene polymorphism and the risk of colon adenoma in African Americans. *PLoS ONE*, **6** (10) : e25314. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025314>

Bai Y., Yu Y., Yu B., Ge J., Ji J., Lu H., Wei J., Weng Z., Tao Z. & Lu J., 2009. - Association of vitamin D receptor polymorphisms with the risk of prostate cancer in the Han population of Southern China. *BMC Medical Genetics*, **10** : 125. doi:10.1186/1471-2350-10-125

Barber Y., Rubio C., Fernandez E., Rubio M. & Fibla J., 2001. - Host Genetic Background at CCR5 Chemokine Receptor and Vitamin D Receptor Loci and Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 1 Disease Progression among HIV-Seropositive Injection Drug Users. *Journal of infectious diseases*, **184** : 1279-1288.

- Barbosa N., Costa L., Pinto M., Rosinha P., Rosinha I. & Couto M., 2014.** - Vitamin D and HIV Infection: A Systematic Review. *Journal of Immunodeficiency & Disorders*, **3** : 1-11.
- Baskara-Yhuellou I., 2013.** - Effet de l'exposition à la fumée de cigarette sur le profil oxydatif et la senescence des différentes sous-populations lymphocytaires T CD4+. Thèse Health, Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, Université Paris-Est, France. 324 p.
- Bazydlo L. A. L., Needham M. & Harris N. S., 2014.** - Calcium, Magnesium, and Phosphate. *Laboratory Medicine*, **45** : e44-e50.
- Beard J. A., Bearden A. & Striker R., 2011.** - Vitamin D and the anti-viral state. *Journal of Clinical Virology*, **50** : 194-200.
- Belorusova A. Y. & Rochel N., 2016.** - Structural Studies of Vitamin D Nuclear Receptor Ligand-Binding Properties. *Vitamins and Hormones*, **100** : 83-116.
- Bergereau E., 2010.** - Rôle des LT-CD8+ dans l'auto-immunité du SNC : influence des autres effecteurs de l'immunité adaptative. Thèse de l'Université de Toulouse, immunologie, Toulouse III, France, 246 p.
- Bernard-Poenaru O. & Guéris J., 1996.** - Parathormone. *Immuno-Analyse et Biologie Spécialisée*, **11** : 24-27.
- Berndt T. & Kumar R., 2009.** - Novel mechanisms in the regulation of phosphorus homeostasis. *Physiology*, **24** : 17-25.
- Best C., Neufingerl N., Del Rosso J. M., Transler C., van den Briel T. & Osendarp S., 2011.** - Can multi-micronutrient food fortification improve the micronutrient status, growth, health, and cognition of schoolchildren? A systematic review. *Nutrition Reviews*, **69** : 186-204.
- Biadgilign S., Reda A. A. & Digaffe T., 2012.** - Predictors of mortality among HIV infected patients taking antiretroviral treatment in Ethiopia: a retrospective cohort study. *AIDS Research and Therapy*, **9** : 15. doi:10.1186/1742-6405-9-15.
- Bikle D. D., 2009.** - Nonclassic Actions of Vitamin D. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **94** : 26-34.
- Bikle D. D., 2011.** - Vitamin D Regulation of Immune Function. In *Vitamins and Hormones*, Ed Gerald Litwack, California, USA. **86** : 1-21

Blaine J., Chonchol M. & Levi M., 2014. - Renal Control of Calcium, Phosphate, and Magnesium Homeostasis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, **10** : 1257-1272.

Borges Á. H., O'Connor J. L., Phillips A. N., Rönsholt F. F., Pett S., Vjecha M. J., French M. A., Lundgren J. D. for the INSIGHT SMART and ESPRIT Study Groups & the SILCAAT Scientific Committee, 2015. - Factors Associated with Plasma IL-6 Levels During HIV Infection. *Journal of Infectious Diseases*, **212** : 585-595.

Bousquet L., 2008. - Etude comparative des thérapies anti-VIH : Rôle des transporteurs d'efflux sur le passage transmembranaire des antirétroviraux au niveau des cellules CD4+ et de la barrière hémato-encéphalique. Thèse de Pharmacie de l'Université Paris XI, France, 225 p.

Bover J. & Cozzolino M., 2011. - Mineral and bone disorders in chronic kidney disease and end-stage renal disease patients: new insights into vitamin D receptor activation. *Kidney International Supplements*, **1** : 122-129.

Boyvin L., Aké J. A., Séri K. L., M'boh G. M., Yapo A. F. & Djaman J. A., 2017. - 25 (OH) Vitamin D level and Calcium/Phosphorus Metabolism Disorders in Patients Living with HIV in Abidjan. *International Journal of Biochemistry Research & Review*, **17** : 1-7.

Boyvin L., M'Boh G., Ake-Edjeme A., Soumahoro-Agbo M. K., Séri K. L. & Djaman J., 2013. - Serum level of two antioxidant vitamins (A and E) in Ivorian (Côte d'Ivoire) people living with human immunodeficiency virus. *Annals of Biological Research*, **4** : 48-54

Bracq L., Xie M., Benichou S. & Bouchet J., 2018. - Mechanisms for Cell-to-Cell Transmission of HIV-1. *Frontiers in Immunology*, **9** : doi: 10.3389/fimmu.2018.00260.

Bringham F. R., Demay M. B. & Kronenberg H. M., 2003. - Hormones and disorders of mineral metabolism. In: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, eds. *Williams Textbook of Endocrinology*. 10th ed. Philadelphia, Pa. Saunders, USA. 1303-1348.

Brisson J., Berube S., Diorio C., Sinotte M., Pollak M. & Masse B., 2007. - Synchronized seasonal variations of mammographic breast density and plasma 25-hydroxyvitamin D. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, **16** : 929-933.

Brown A. J., Dusso A. S. & Slatopolsky E., 1999. - Vitamin D. *American Journal of Physiology*, **277** : F157- F 175.

- Brown A. J., Zhong M., Finch J., Ritter C. & Slatopolsky E., 1995.** - The roles of calcium and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in the regulation of vitamin D receptor expression by rat parathyroid glands. *Endocrinology*, **136** : 1419-1425.
- Brown T. T. & Qaqish R. B., 2006.** - Antiretroviral therapy and the prevalence of osteopenia and osteoporosis: a meta-analytic review. *AIDS*, **20** : 2165-2174.
- Calvo M. S. & Uribarri J., 2013.** - Contributions to total phosphorus intake: all sources considered. *Seminars in dialysis*, **26** : 54-61.
- Capeau J., Magre J., Reynet C., Caron M., Cochet I., Lascols O., Levy P., Picard J. & Cherqui G., 1992.** - The insulin receptor and its regulation. *Réanimation Urgences*, **1** : 409-420.
- Cao Y., Wang X., Cao Z. & Cheng X., 2015.** - Association of Vitamin D receptor gene TaqI polymorphisms with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, **8** : 10187-10203.
- Carlberg C. & Polly P., 1998.** - Gene regulation by vitamin D₃. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, **8** : 19-42.
- Carlberg C., Seuter S., De Mello V. D. F., Schwab U., Voutilainen S., Pulkki K., Nurmi T., Virtanen J., Tuomainen T. & Uusitupa M., 2013.** - Primary Vitamin D Target Genes Allow a Categorization of Possible Benefits of Vitamin D₃ Supplementation. *PLOS ONE*, **8** : 1-7.
- Catignani G. L. & Bieri J. G., 1983.** - Simultaneous determination of retinol and tocopherol in serum or plasma by liquid chromatography. *Clinical Chemistry*, **29** : 708-712.
- Celep G. S., Kaynar P. & Rastmanesh R., 2017.** - Biochemical Functions of Micronutrients. *Advances in Obesity, Weight Management & Control*, **6** : 43-45.
- Chacon-Cortes D. & Griffiths L.R., 2014.** - Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine*, **2** : 1-9.
- Chaillet P., Tayler-Smith K., Zachariah R., Duclos N., Moctar D., Beelaert G., Fransen K., 2010.** - Evaluation of four rapid tests for diagnosis and differentiation of HIV-1 and HIV-2 infections in Guinea-Conakry, West Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **104** : 571-576.
- Chaix F. & Goujard C., 2009.** - Antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus infection. *Revue de médecine interne*, **30** : 543-554.

- Chakraborty A., Mishra A. K., Soni A., Regina T., Mohil R., Bhatnagar D., Bhatnagar A., Chintamani C., Sharma P. C. & Saxena S., 2009.** - Vitamin D receptor gene polymorphism(s) and breast cancer risk in north Indians. *Cancer Detection and Prevention*, **32** : 386-394.
- Chandel N., Malhotra A. & Singhal P. C., 2015.** - Vitamin D receptor and epigenetics in HIV infection and drug abuse. *Frontiers in Microbiology*, **6** : 788. doi: 10.3389/fmicb.2015.00788
- Chaves H. L., Corrêa H. A. H., Machado W. B. O., Teles R. B., Nascimento L. R., Filho J. B. B., Queiroz C. C. C. R, Nóbrega D. G., Moreira A. C. V., Meneses M. C. N. A., Bezerra F. M., Medeiros M. S. & Moreira H. P., 2014.** - Vitamin D and Secondary Hyperparathyroidism in HIV Infected Patients Taking Antiretroviral Therapy. *World Journal of AIDS*, **4** : 430-437.
- Chawla A., Repa J. J., Evans R. M. & Mangelsdorf D. J., 2001.** - Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science*, **294** : 1866-1870.
- Chen C., Liu Q., Zhu L., Yang H. & Wei Lu W., 2013.** - Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms on the Risk of Tuberculosis, a Meta-Analysis of 29 Case-Control Studies. *PLoS ONE*, **8** : 1-11.
- Chen K. S. & DeLuca H. F., 1995.** - Cloning of the human 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D-3 24-hydroxylase gene promoter and identification of two vitamin D responsive elements. *Biochimica et Biophysica Acta* , **1263** : 1-9.
- Chen T. C., Chimeh F., Lu Z., Mathieu J., Person K. S., Zhang A., Kohn N., Martinello S., Berkowitz R. & Holick M. F., 2007.** - Factors that influence the cutaneous synthesis and dietary sources of vitamin D. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **460** : 213-217.
- Cherqaoui R., Shakir K. M. M., Shokrani B., Madduri S., Farhat F., & Mody V., 2014.** - Histopathological Changes of the Thyroid and Parathyroid Glands in HIV-Infected Patients. *Journal of Thyroid Research*, 7p. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/364146>
- Chimah U. C., Lawoyin T. O., Nnebue C. C. & Ilika A. L., 2015.** - Survey of Knowledge and Source of Information Relating to Reproduction and Sexually Transmitted Infections among Senior Secondary Schools Students in a Military Barracks in Nigeria. *British Journal of Medicine & Medical Research*, **7** : 884-894.
- Civitelli R. & Ziambaras K., 2011.** - Calcium and phosphate homeostasis: concerted interplay of new regulators. *Journal of endocrinological investigation*, **34** : 3-7.

- Conesa-Botella A., Florence E., Lynen L., Colebunders R., Menten J. & Moreno-Reyes R., 2010.** - Decrease of vitamin D concentration in patients with HIV infection on a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-containing regimen. *AIDS Research and Therapy*, **7** : 40.
- Conesa-Botella A., Mathieu C., Colebunders R., Moreno-Reyes R., Etten E. V., Lynen L. & Kestens L., 2009.** - Is vitamin D deficiency involved in the immune reconstitution inflammatory syndrome? *AIDS Research and Therapy*, **6** : 1-5.
- Couret J. & Chang T. L., 2016.** - Reactive Oxygen Species in HIV Infection. *EC Microbiology*, **3** (6) : 597-604.
- Coussens A. K., Naude C. E., Goliath R., Chaplin G., Wilkinson R. J. & Jablonski N. G., 2015.** - High-dose vitamin D3 reduces deficiency caused by low UVB exposure and limits HIV-1 replication in urban Southern Africans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112** : 8052-8057.
- Coxam V., Davicco, M. & Wittrant Y., 2014.** - Vitamine D et santé osseuse. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, **49** : 260-266.
- Cozzolino M., Vidal M., Arcidiacono M. V., Tebas P., Yarasheski K. E. & Dusso A. S., 2003.** - HIV-protease inhibitors impair vitamin D bioactivation to 1,25-dihydroxyvitamin D. *AIDS*, **17** : 513-520.
- D'Amour P., 2012.** - Acute and chronic regulation of circulating PTH: Significance in health and in disease. *Clinical biochemistry*, **45** : 964-969.
- de la Torre M. S., Torres C., Nieto G., Vergara S., Carrero A. J., Macías J., Pineda J. A., Caruz A. & Fibla J., 2008.** - Vitamin D Receptor Gene Haplotypes and Susceptibility to HIV-1 Infection in Injection Drug Users. *Journal of Infectious Diseases*, **197** : 405-410.
- Deluca H. F. & Cantorna M. T., 2001.** - Vitamin D: its role and uses in immunology. *The FASEB Journal*, **15** : 2579-2585.
- Deluca H. F., 2014.** - History of the discovery of vitamin D and its active metabolites. *BoneKEy Reports*, **3** : 479. doi:10.1038/bonekey.2013.213.
- De Vernejoul M. C. & Marie P. J., 1996.** - Cellules osseuses et remodelage osseux. In : Kuntz D, ed. *Maladies métaboliques osseuses de l'adulte*. Paris, Flammarion, 3 - 16.

- Deyhimi F., Arabieh M. & Parvin L., 2006.** - Optimization of the Emerson–Trinder enzymatic reaction by response surface methodology. *Biocatalysis and Biotransformation*, **24** : 263-271.
- Diorio C., Pollak M., Byrne C., Masse B., Hebert-Croteau N., Yaffe M., Cote G., Berube S., Morin C. & Brisson J., 2005.** - Insulin-like growth factor-I, IGF-binding protein-3, and mammographic breast density. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, **14** : 1065-1073.
- Don G., Catherine L., D'Arcy L., Keith G., Chris S., 2002.** - Biologie 11. Chenelière/McGraw-Hill ; xv : 688p.
- Dorosz P., 2004.** - Vitamines, sels minéraux et oligo-éléments. 2ème édition revue et augmentée, Maloine, Paris. 154 p.
- Duplancic D., Cesarik M., Poljak N. K., Radman M., Kovacic V., Radic J. & Rogosic V., 2013.** - The influence of selective vitamin D receptor activator paricalcitol on cardiovascular system and cardiorenal protection. *Clinical Interventions in Aging*, **8** : 149-156.
- Dusso A. S., Brown A. J., Slatopolsky E., Adriana S. & Am V. D., 2005.** - Vitamin D. *American Journal of Physiology*, **289** : F8-F28.
- Edwards M. H., Cole Z. A., Harvey N. C. & Cooper C., 2014.** - The global epidemiology of vitamin D status. *The Journal of Aging Research & Clinical Practice*, **3** : 148-158.
- Egan J. B., Thompson P. A., Vitanov M. V., Bartik L., Jacobs E. T., Haussler M. R., Gerner E. W. & Jurutka P. W., 2010.** - Vitamin D receptor ligands, adenomatous polyposis coli, and the vitamin D receptor FokI polymorphism collectively modulate beta-catenin activity in colon cancer cells. *Molecular Carcinogenesis*, **49** : 337-352.
- Eloranta J. J. & Kullak-Ublick G. A., 2005.** - Coordinate transcriptional regulation of bile acid homeostasis and drug metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **433** : 397-412.
- Escriva H., Safi R., Hanni C., Langlois M. C., Saumitou-Laprade P., Stehelin D., Capron A., Pierce R. & Laudet V., 1997.** - Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94** : 6803-6808.
- Etten E., Verlinden L., Giulietti A., Ramos-Lopez E., Branisteanu D. D., Ferreira G. B., Overbergh L., Verstuyf A., Bouillon R., Roep B. O., Badenhoop K. & Mathieu C., 2007.** - The vitamin D receptor gene FokI polymorphism: Functional impact on the immune system. *European Journal Of Immunology*, **37** : 395-405.

Falchetti A., Rossi E., Cosso1 R., Buffa A., Corvaglia S. & Malavolta N., 2016. -Vitamin D and Bone Health. *Food and Nutrition Sciences*, **7** : 1033-1051.

Fan H. & Margaret L. G., 2001. - Methods in Molecular Medicine. In Molecular Pathology Protocols. Ed A. A. Killeen[©] Humana Press Inc., Totowa, NJ. **49** : 7 p.

Faraco J. H., Morrison N. A., Baker A., Shine J. & Frossard P.M., 1989. - ApaI dimorphism at the human vitamin D receptor gene locus. *Nucleic Acids Research*, **17** : 2150. DOI : 10.1093/nar/17.5.2150.

Feng Y., Li L. & Sun X. H., 2011. - Monocytes and Alzheimer's disease. *Neuroscience Bulletin*, **27** : 115.

Fener P. & Criton C., 2007. - Manifestations cliniques et biologiques de l'infection `a VIH/sida chez la femme. [Rapport de recherche] INIST-V - 07-04, Institut de l'Information Scientifique et Technique (INIST-CNRS). 125 p. (Consulté 05/05/2017)

Filus A., Trzmiel A., Kuliczowska-Plaksej J., Tworowska U., Jedrzejuk D., Milewicz A. & Mędraś M., 2008. - Relationship between vitamin D receptor BsmI and FokI polymorphisms and anthropometric and biochemical parameters describing metabolic syndrome. *Aging Male*, **11** : 134-139.

Fleury H. J. A., 2002. - Virologie Humaine. 4 éd MASSON, Paris. 245 p.

Fleury H. J. A., 2009. - Virologie Humaine. 5 éd MASSON, Paris. 265 p.

Fourati S., 2012. - Contribution des protéines régulatrices Vif et Vpr du VIH-1 dans la résistance aux antirétroviraux chez des patients en échec virologique. Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris, France. 101p.

Fox J., Peters B., Prakash M., Arribas J., Hill A. & Moecklinghoff C., 2011. Improvement in vitamin D deficiency following antiretroviral regime change: results from the MONET trial. *AIDS Research and Human Retroviruses*, **27** : 29-34.

Fukagawa M. & Kazama J., 2005. - With or without the kidney : the role of FGF 23 in CKD. *Nephrology Dialysis Transplantation*, **20** : 1295-1298.

Gao X. H., Dwivedi P. P., Omdahl J. L., Morris H. A., May B. K., 2004. - Calcitonin stimulates expression of the rat 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase (CYP24) promoter in HEK-293 cells

expressing calcitonin receptor: identification of signaling pathways. *Journal of Molecular Endocrinology*, **32** : 87-98.

Garibyan L. & Avashia N., 2013. - Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *Journal of Investigate Dermatology*, **133** : 1-6.

Gautheret-Dejean A., Bocobza J., Brunet S., Damond F., Plantier J, C. & Barin F., 2015. - Performance of rapid tests for discrimination between HIV-1 and/or HIV-2 infections. *Journal of medical virology*, **87** : 2061-2066.

Gauzzi M. C., Purificato C., Donato K., Jin Y., Wang L., Daniel K. C., Maghazachi A. A., Belardelli F., Adorini L. & Gessani S., 2005. - Suppressive effect of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on type I IFN-mediated monocyte differentiation into dendritic cells: Impairment of functional activities and chemotaxis. *Journal of Immunology*, **174** : 270–276.

Ghatak S., Muthukumaran R. B. & Nachimuthu S. K., 2013. - A Simple Method of Genomic DNA Extraction from Human Samples for PCR-RFLP Analysis. *Journal of Biomolecular Techniques*, **24** : 224-231.

Ghosh A. K. & Joshi S. R., 2008. - Disorders of calcium, phosphorus and magnesium metabolism. *Journal of the Association of Physicians of India*. **56** : 613-621.

Ghosn J. & Viard J. P., 2013. - Vitamin D and infectious diseases. *Presse Medicale*, **42** : 1371-1376.

Giacomet V., Vigano A., Manfredini V., Cerini C., Bedogni G., Mora S., Borelli M., Trabattoni D. & Zuccotti G. V., 2013. - Cholecalciferol Supplementation in HIV Infected Youth with Vitamin D Insufficiency: Effects on Vitamin D Status and T-Cell Phenotype: A Randomized Controlled Trial. *HIV Clinical Trials*, **14** : 51-60.

Gichuhi C.W., Kariuki D., Nyerere A. & Riyat M., 2014. - Studies on Vitamin D Levels in Serum of HIV Infected Patients: Their Effect on Progression towards AIDS. *World Journal of AIDS*, **4** : 422-429.

Gil A., Plaza-Diaz J. & Mesa M. D., 2018. - Vitamin D: Classic and Novel Actions. *Annal of Nutrition & Metabolism*, **72** : 87-95.

Goff J. P., 2000. - Pathophysiology of calcium and phosphorus disorders. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, **16** : 319-337.

- Gong G., Stern H. S., Cheng S. C., Fong N., Mordeson J., Deng H. W. & Recker R. R., 1999.** - The association of bone mineral density with vitamin D receptor gene polymorphisms. *Osteoporosis International*, **9** : 55-64.
- Gregory S. G., Barlow K. F. & McLay K. E., 2006.** - The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1. *Nature*, **441** : 315-321.
- Guilland J-C., 2015.** La vitamine D. Éd. Lavoisier, France. 363 p.
- Gürtler L. G., Hauser P. H., Eberle J., von Brunn A., Knapp S., Zekeng L., Tsague J. M. & Kaptue L., 1994.** - A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *Journal of Virology*, **68** : 1581-1855.
- Habener J. F., Rosenblatt M. & Potts J. T., 1984.** - Parathyroid Hormone: Biochemical Aspects of Biosynthesis, Secretion, Action, and Metabolism. *Physiological Reviews*, **64** : 985-1053.
- Haidara A., 2012.** - Étude de la résistance des sous-types non-B du VIH-1 aux antirétroviraux au Mali. Faculté de médecine. Thèse de Doctorat de Virologie et Immunologie. Université de Montréal. 243 p.
- Hamadé A., Bhanini S., Saade T., Fakh Y., Fakh C., Azzil R., Hazouri M. & Rizk F., 2014.** - Vitamin D Levels in Serum, Vitamin D Receptor Polymorphisms and Semen Quality Correlations in Lebanon: A Pilot Cross-Sectional Study. *Universal Journal of Public Health*, **2** : 118-124.
- Hamzah L., Tiraboschi J. M., Iveson H., Toby M., Mant C., Cason J., Burling K., Wandolo E., Jendrulek I., Taylor C., Ibrahim F., Kulasegaram R., Teague A., Post F. A. & Fox J., 2016.** - Effects on vitamin D, bone and the kidney of switching from fixed-dose tenofovir disoproxil fumarate/emtricitabine/efavirenz to darunavir/ritonavir monotherapy: a randomized, controlled trial (MIDAS). *Antiviral therapy*, **21** : 287-296.
- Handel A. E., Sandve G. K., Disanto G., Berlanga-Taylor A. J., Gallone G., Hanwell H., Drabløs F., Giovannoni G., Ebers G. C. & Ramagopalan S. V., 2013.** - Vitamin D receptor ChIP-seq in primary CD4+ cells: relationship to serum 25-hydroxyvitamin D levels and autoimmune disease. *BMC Medicine*, **11** : 1-11.
- Haug C. J., Aukrust P., Haug E., Mørkrid L., Müller F. & Frøland S. S., 1998.** - Severe Deficiency of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in Human Immunodeficiency Virus Infection: Association with Immunological Hyperactivity and Only Minor Changes in Calcium Homeostasis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **83** : 3832- 3838.

- Haussler M. R., Haussler C. A., Bartik L., Whitfield G. K., Hsieh J.-C., Slater S. & Jurutka P. W., 2008.** - Vitamin D receptor: molecular signaling and actions of nutritional ligands in disease prevention. *Nutrition Reviews*, **66** : 98-112.
- Haussler M. R., Jurutka P. W., Mizwicki M. & Norman A. W., 2011.** - Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 alpha,25 (OH)₂ vitamin D₃: genomic and non-genomic mechanisms. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, **25** : 543-559.
- Haussler M. R., Myrtle J. F. & Norman A. W., 1968.** - The association of a metabolite of vitamin D₃ with intestinal mucosa chromatin in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, **243** : 4055-4064.
- Havens P. L., Stephensen C. B., Hazra R., Flynn P. M., Wilson C. M., Rutledge B., Bethel J., Pan C. G., Woodhouse L. R., Van Loan M. D., Liu N., Lujan-Zilbermann J., Baker A., Kapogiannis B. G., Mulligan K. & the Adolescent Medicine Trials Network (ATN) for HIV/AIDS Interventions 063 study team, 2012.** - Vitamin D₃ Decreases Parathyroid Hormone in HIV-Infected Youth Being Treated with Tenofovir: A Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Clinical Infectious Diseases*, **54** : 1013-1025.
- Havers F. P., Detrick B., Cardoso S. W., Berendes S., Lama J. R., Sungandhavesa P., Mwelase N. H., Campbell T. B., Gupta A., ACTG A5175 PEARLS & NWCS319 Study Teams, 2014a.** - Change in vitamin D levels occurs early after antiretroviral therapy initiation and depends on treatment regimen in resource-limited settings. *PLoS ONE*, **9** : e95164.
- Havers F., Smeaton L., Gupte N., Detrick B., Bollinger R. C., Hakim J., Kumarasamy N., Andrade A., Christian P., Lama J. R., Campbell T. B., Gupta A., ACTG PEARLS & NWCS 319 Study Teams, 2014b.** - 25-Hydroxyvitamin D insufficiency and deficiency is associated with HIV disease progression and virological failure post-antiretroviral therapy initiation in diverse multinational settings. *The Journal of infectious diseases*, **210** : 244-253.
- Haynes L. P., McCue H. V. & Burgoyne R. D., 2012.** - Evolution and functional diversity of the Calcium Binding Proteins (CaBPs). *Frontiers in Molecular Neuroscience*, **5** : 9.
- Hellman P., Karlsson-Parra A., Klareskog L., Ridefelt P., Bjerneroth G., Rastad J., Akerstrom G., Juhlin C., Brunt L. M. & McHenry C. R., 1996.** - Expression and function of a CD4-like molecule in parathyroid tissue. *Surgery*, **120** : 985-992.
- Hewison M., 2011.** - Vitamin D and Innate and Adaptive Immunity. In *Vitamins and Hormones*. Elsevier Inc., San Francisco, California, USA. **86** : 23-62.

- Hidreau P., 2006.** - L'épidémie du VIH/SIDA et sa situation dans un pays en voie de développement : le Bénin. Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie, Université de Nantes, France. 102 p.
- Hileman C.O., Overton E. T. & Mc Comsey G. A., 2016.** - Vitamin D and Bone Loss in HIV. *Current Opinion in HIV and AIDS*, **11** : 277-284.
- Hohenstein A., Hebell M., Zikry H., El Ghazaly M., Mueller F. & Rohde J., 2014.** - Development and validation of a novel cell-based assay for potency determination of human parathyroid hormone (PTH). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **98** : 345-350.
- Holick M. F., 1999.** - Vitamin D. In: Modern nutrition in health and Disease. Shils M. E., Olson J. A., Shike M., Ross A. C. (Eds.). 19th edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 329-345.
- Holick M. F., 2004.** - Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *American Journal of Clinical Nutrition*, **79** : 362-371.
- Holick M. F., 2007.** - Medical Progress: Vitamin D Deficiency. *New England Journal of Medicine*, **357** : 266-281.
- Hollis B. W., Wagner C. L., Drezner M. K. & Binkley N. C., 2007.** - Circulating Vitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D in Humans: An Important Tool to Define Adequate Nutritional Vitamin D Status. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **103** : 631-634.
- Hønge B. L., Bjarnason O. M. P., Jespersen S., Medina C, Té D. S., da Silva Z. J, Østergaard L., Laursen A. L., Wejse C. & Erikstrup C., 2014.** - Performance of 3 rapid tests for discrimination between HIV-1 and HIV-2 in Guinea-Bissau, West Africa. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, **65** : 87-90.
- Hønge B. L., Jespersen S., Olesen J. S., Erikstrup C. & Wejse C., 2015.** - Rapid tests for HIV type discrimination in West Africa may perform differently. *Journal of the International AIDS Society*, **18** : 19460. DOI : 10.7448/IAS.18.1.19460
- Hossein-Nezhad A., Eshaghi S. M., Maghbooli Z., Mirzaei K., Shirzad M., Curletto B. & Chen T. C., 2014.** - The Role of Vitamin D Deficiency and Vitamin D Receptor Genotypes on the Degree of Collateralization in Patients with Suspected Coronary Artery Disease. *BioMed Research International*, 2014. DOI : 10.1155/2014/304250
- Houillier P., 2008.** - Physiologie des parathyroïdes. Elsevier Masson SAS, Paris. *Endocrinologie-nutrition*, 10-011-C-10. 13 p.

- Huang H., Caballero B., Chang S., Alberg A. J., Semba R. D., Schneyer C., Wilson R. F., Cheng T. Y. & Prokopoicz G., 2007.** - Multivitamin/Mineral supplements and prevention of chronic disease: executive summary. *American Journal of Clinical Nutrition*, **85** : 265S-268S
- Huraux J. M., Agut H., Nicolas J. C. & Peigue-Lafeuille H., 2003.** - Traité de Virologie Médicale. Ed ESTEM, Paris. 699 p.
- Hustmyer F. G., DeLuca H. F. & Peacock M., 1993.** - Apa I, Bsm I, EcoRV, and Taq I polymorphism at the vitamin D receptor gene locus in Caucasians, Blacks and Asians. *Human Molecular Genetics*, **2** : 487.
- Iloh O. N., Ubesie A. C., Iloh K. K., Emodi I. J., Ikefuna A. N. & Obumneme-Anyim I., 2016.** - Poor Physical Growth among Perinatally HIV-infected Girls despite Anti-retroviral Therapy in Enugu, South-East Nigeria. *World Journal of Nutrition and Health*, **4** : 22-26.
- Indridason O. S. & Quarles L. D., 2002.** - Hyperphosphatemia in end-stage renal disease. *Advances in Renal Replacement Therapy*, **9** : 184-192.
- Iordanskiy S., Duyne R. V., Sampey G. C., Woodson C. M., Fry K., Saifuddin M., Guo J., Wu Y., Romerio F. & Kashanchi F., 2015.** - Therapeutic doses of irradiation activate viral transcription and induce Apoptosis in HIV-1infectedcells. *Virology*, **485** : 1-15.
- Israel N., Gougerot-Pocidallo M. A., Aillet F. & Virelizier J. L., 1992.** - Redox status of cells influences constitutive or induced NF-kb translocation and HIV long terminal repeat in human R and monocytic cell lines. *The Journal of Immunology*, **149** : 3386-3393.
- Jaeger P., Otto S., Speck R. F., Villiger L., Horber F. F, Casez J. P. & Takkinen R., 1994.** - Altered parathyroid gland function in severely immunocompromised patients infected with human immunodeficiency virus. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **79** : 1701-1705.
- Janoly-Dumenil A., 2008.** - Optimisation des modalités thérapeutiques de l'infection a cmv en post-transplantation de moelle osseuse pédiatrique par l'étude in vitro des relations PK/PD de l'efficacité antivirale et de la toxicité cellulaire du ganciclovir. Thèse de l'Ecole Doctorale de Biologie Santé et Environnement de l'Universite Henri Poincaré - Nancy 1, France. 221 p.
- Ji G. R., Yao M., Sun C. Y., Li Z. H. & Han Z., 2010.** - BsmI, TaqI, ApaI and FokI polymorphisms in the vitamin D receptor (VDR) gene and risk of fracture in Caucasians: a meta-analysis. *Bone*, **47** : 681-686.

Joshi L., Ponnana M., Penmetsa S. R., Nallari P., Valluri V. & Gaddam S., 2014. - Serum Vitamin D Levels and VDR Polymorphisms (BsmI and FokI) in Patients and their Household Contacts Susceptible to Tuberculosis. *Human Immunology*. 114-119. DOI: 10.1111/sji.12127

Júnior F. C. M., Mandarino N. R., Santos E. M., Santos A. M., Salgado J. V., Brito D. J. A., Salgado B. J. L., Lages J. S., Branco G. C. & Filho N. S., 2018. - Correlation between serum 25-hydroxyvitamin D levels and carotid intima-media thickness in a Brazilian population descended from African slaves. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **51** : 1-8.

Jurutka P. W., Remus L. S., Whitfield G. K., Thompson P. D., Hsieh J. C., Zitzer H., Tavakkoli P., Galligan M. A., Dang H. T., Haussler C. A. & Haussler M. R., 2000. - The polymorphic N terminus in human Vitamin D receptor isoforms influences transcriptional activity by modulating interaction with transcription factor IIB. *Molecular Endocrinology*, **14** : 401-420.

Kandar R. & Zakova, P., 2009. - Determination of 25-hydroxyvitamin D3 in human plasma using HPLC with UV detection based on SPE sample preparation. *Journal of Separation Sciences*, **32**: 2953-2957.

Kéita M., 2014. - Etude des arrêts des premières lignes de traitements antirétroviraux à l'ère de la stratégie « Seek, Test, Treat, and Retain (STTR) ». Thèse de l'université Toulouse 3 - Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier), France. 243 p.

Khan M. I., Bielecka Z. F., Najm M. Z., Bartnik E., Czarnecki J. S., Czarnecka A. M. & Szczylik C., 2014. - Vitamin D receptor gene polymorphisms in breast and renal cancer: Current state and future approaches (Review). *International Journal of Oncology*, 349-363. DOI.org/10.3892/ijco.2013.2204.

Khazai N. B., Judd S. E., Jeng L., Wolfenden L. L., Stecenko A., Ziegler T. R. & Tangpricha V., 2009. - Treatment and prevention of vitamin D insufficiency in cystic fibrosis patients: comparative efficacy of ergocalciferol, cholecalciferol, and UV light. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **94** : 2037-2043.

Kim J. H., Gandhi V., Pseudos Jr. G., Espinoza F., Park J. & Sharp V., 2011. - Evaluation of Vitamin D Levels among HIV-Infected Patients in New York City. *AIDS Research and Human Retroviruses*, **28** : 235-241.

Kim M. & Jay H., 2017. - Vitamin D Deficiency, Its Role in Health and Disease, and Current Supplementation Recommendations. *The Journal of the American Osteopathic Association*, **117** : 301 - 305.

- Klassen K. M., Fairley C. K., Kimlin M. G., Hocking J., Kelsall L. & Ebeling P. R., 2016.** - Vitamin D deficiency is common in HIV-infected southern Australian adults. *Antiviral therapy*, **21** (2) : 117-125.
- Klassen K., Martineau A. R., Wilkinson R. J., Cooke G., Courtney A. P., Hickson M., 2012.** - The Effect of Tenofovir on Vitamin D Metabolism in HIV-Infected Adults Is Dependent on Sex and Ethnicity. *PLoS ONE*, **7** (9) : e44845.
- Köstner K., Denzer N., Müller C. S. L., Klein R., Tilgen W. & Reichrath J., 2009.** - The Relevance of Vitamin D Receptor (VDR) Gene Polymorphisms for Cancer: A Review of the Literature. *Anticancer Research*, **29** : 3511-3536.
- Kotler D. P., 1998.** - Antioxidant therapy and HIV infection. *American Journal of Clinical Nutrition*, **67** : 7-9.
- Kramer P. A., Chacko B. K., Ravi S., Johnson M. S., Mitchell T. & Darley-Usmar V. M., 2014.** - Bioenergetics and the Oxidative Burst: Protocols for the Isolation and Evaluation of Human Leukocytes and Platelets. *Journal of Visualized Experiments*, **85** : 1-9.
- Kroner J. C., Sommer A. & Fabri M., 2015.** - Vitamin D Every Day to Keep the Infection Away? *Nutrients*, **7** : 4170-4188.
- Lake J. E. & Adams J. S., 2011.** - Vitamin D in HIV-Infected Patients. *Current HIV/AIDS Reports*, **8** : 133-141.
- Landrier J.-F., 2014.** – Vitamine D : sources, métabolisme et mécanismes d’action. *Oilseeds & Fats Crops and Lipids*, **21** : 1-7.
- Lane, 2010.** - Pathogenesis of HIV Infection : Total CD4+ T-Cell Pool, Immune Activation, and Inflammation. *Topics in HIV Medicine*, **18** : 2-6.
- Lang P.O., Samaras N., Samaras D. & Aspinall R. 2013.** - How important is vitamin D in preventing infections? *Osteoporosis International*, **24** : 1537-1553.
- Laplana M., Sánchez-de-la-Torre M., Puig T., Caruz A. & Fibla J., 2014.** - Vitamin-D pathway genes and HIV-1 disease progression in injection drug users. *Gene*, **545** : 163-169.
- Larcombe L. A., Orr P. H., Lodge A. M., Brown J. S., Dembinski I. J., Milligan L. C., Larcombe E. A., Martin B. D. & Nickerson P. W., 2008.** - Functional gene polymorphisms in canadian

aboriginal populations with high rates of tuberculosis. *Journal of Infectious Diseases*, **198** :1175-1179.

Larriba M. J., González-Sancho J. M., Barbáchano A., Niell N., Ferrer-Mayorga G. & Muñoz A., 2013. - Vitamin D is a multilevel repressor of Wnt/ β -catenin signaling in cancer cells. *Cancers*, **5**. DOI:10.3389/fphys.2014.00060

Lawn S. D., Harries A. D., Anglaret X., Myer L. & Wood R., 2008. - Early mortality among adults accessing antiretroviral treatment programmes in sub-Saharan Africa. *AIDS*, **22** : 1897-1908.

Lensmeyer G. L., Wiebe D. A., Binkley N. & Drezner M. K., 2006. - HPLC Method for 25-Hydroxyvitamin D Measurement: Comparison with Contemporary Assays. *Clinical Chemistry*, **52** : 1120-1126.

Lerma E., Molas M. E., Montero M. M., Guelar A., González A., Villar J., Diez A. & Knobel H., 2012. - Prevalence and Factors Associated with Vitamin D Deficiency and Hyperparathyroidism in HIV-Infected Patients Treated in Barcelona. *International Scholarly Research Network AIDS*, **2012** : 485307.

Levy J. A., 2007. - HIV and the pathogenesis of AIDS. 3rd ed. Washington, DC. American Society of Microbiology Press. 644 p.

Li J., Molnar M. Z., Zaritsky J. J., Sim J. J., Streja E., Kovesdy C. P., Salusky I. & Kalantar-Zadeh K., 2013. - Correlates of parathyroid hormone concentration in hemodialysis patients. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, **28** : 1516-1525.

Lindroth P & Mopper K, 1979. - High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amount of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with ophtaldialdéhyde. *Analytical Chemistry*, **51** : 1667-1674.

Luis D. A., Bachiller P., Aller R., de Luis J., Izaola O., Terroba M. C., Cuellar L. & González Sagrado M., 2002. - Relation among Micronutrient Intakes with CD4 Count in HIV Infected Patients. *Nutricion Hospitalaria*, **17** : 285-289.

Maaty M. A. A., Hanafi R. S., Aboul-Enein H. Y. & Gad M. Z., 2015. - Design-of-Experiment Approach for HPLC Analysis of 25-Hydroxyvitamin D: A Comparative Assay with ELISA. *Journal of Chromatographic Science*, **53** : 66-72.

Mackawy A. M. H. & Badawi M. E. H., 2014. - Association of vitamin D and vitamin D receptor gene polymorphisms with chronic inflammation, insulin resistance and metabolic syndrome components in type 2 diabetic Egyptian patients. *Meta Gene*, **2** : 540-556.

Madhad V. J. & Sentheil K. P., 2014. - The Rapid and Non-Enzymatic isolation of DNA from the Human peripheral whole blood suitable for Genotyping. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, **1** : 1-16.

Mahmoud A. A. & Ali A. H. K., 2014. - Vitamin D receptor gene polymorphism and 25 hydroxy vitamin D levels in Egyptian patients with pulmonary tuberculosis. *Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis*, **63** : 651-655.

Małodobra-Mazur M., Paduch A., Lebioda A., Konopacka M., Rogoliński J., Szymczyk C., Wierzgoń J., Maciejewski A., Chmielik E., Jonkisz A., Póltorak S. & Dobosz T., 2012. - VDR gene single nucleotide polymorphisms and their association with risk of oral cavity carcinoma. *Acta Biochimica Polonica*, **59** : 627- 630.

Mangin M., Sinha R. & Fincher K., 2014. - Inflammation and vitamin D: the infection connection. *Inflammation Research*, **63** : 803-819.

Mansueto P., Seidita A., Vitale G., Gangemi S., Iaria C. & Cascio A., 2015. - Vitamin D Deficiency in HIV Infection : Not Only a Bone Disorder. *BioMed Research International*, **2015**. Doi : 10.1155/2015/735615

Masiá M., Padilla S., Fernández M., Rodríguez C., Moreno A., Oteo J. A., Antela A., Moreno S., del Amo J. & Gutiérrez F., 2016. -Oxidative Stress Predicts All-Cause Mortality in HIV-Infected Patients. *PLoS ONE*, **11** : 1-12.

Masuyama H. & MacDonald P. N., 1998. - Proteasome-mediated degradation of the vitamin D receptor (VDR) and a putative role for SUG1 interaction with the AF-2 domain of VDR. *Journal of Cellular Biochemistry*, **71** : 429-440.

Masuyama H., Jefcoat S. C. Jr. & MacDonald P. N., 1997. - The N-terminal domain of transcription factor IIB is required for direct interaction with the vitamin D receptor and participates in vitamin D-mediated transcription. *Molecular Endocrinology*, **11** : 218-228.

Maurya R., Kumar B. & Sundar S., 2013. - Evaluation of salt-out method for the isolation of DNA from whole blood: a pathological approach of DNA based diagnosis. *International Journal of Life Sciences Biotechnology Pharma Research*, **2** : 53-57.

- McGrath J. J., Saha S, Burne T. H. & Eyles D. W., 2010.** A systematic review of the association between common single nucleotide polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D concentrations. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **121** : 471-477.
- McNamara L., Takuva S., Chirwa T. & MacPhail P., 2016.** - Prevalence of common vitamin D receptor genopolymorphisms in HIV-infected and uninfected South Africans. *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*, **7** : 74-80.
- Menck K., Behme D., Pantke M., Reiling N., Binder C., Pukrop T. & Klemm F., 2014.** - Isolation of Human Monocytes by Double Gradient Centrifugation and Their Differentiation to Macrophages in Teflon-coated Cell Culture Bags. *Journal of Visualized Experiments*, **91** : 1-10.
- Mezquita-Raya P., Muñoz-Torres M., Luna J. D., Luna V., Lopez-Rodriguez F., Torres-Vela E. & Escobar-Jimenez F., 2001.** - Relation between vitamin D insufficiency, bone density, and bone metabolism in healthy postmenopausal women. *Journal of bone and mineral research*, **16** : 1408-1415.
- Michels T. C. & Kelly K. M., 2013.** - Parathyroid Disorders. *American Family Physician*, **88** : 249-257.
- Milovanova L., Milovanov Y. & Plotnikova A., 2012.** - Phosphorus and Calcium Metabolism Disorders Associated with Chronic Kidney Disease Stage III-IV (Systematic Review and Meta-Analysis). In *Chronic Kidney Disease and Renal Transplantation*, Prof. Manisha Sahay (Ed.), ISBN: 978-953-51-0003-4, InTech. pp 95-119.
- Mishra D. K., Wu Y., Sarkissyan M., Sarkissyan S., Chen Z., Shang X., Ong M., Heber D., Koeffler H. P. & Vadgama J. V., 2013.** - Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms and Prognosis of Breast Cancer among African-American and Hispanic Women. *PLoS ONE*, **8** : e57967.
- Mitsuyasu R., 1999.** - Oncological Complications of Human Immunodeficiency Virus Disease and Hematologic Consequences of Their Treatment. *Clinical Infectious Diseases*, **29** : 35-43.
- Miyamoto K., Kesterson R. A., Yamamoto H., Taketani Y., Nishiwaki E., Tatsumi S., Inoue Y., Morita K., Takeda E. & Pike J. W., 1997.** - Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Molecular Endocrinology*, **11** : 1165-1179.
- Moe S. M., 2008.** - Disorders Involving Calcium, Phosphorus, and Magnesium. *Primary Care - Clinics in Office Practice*, **35** : 215-237

- Moges B., Amare B., Yabutani T. & Kassu A., 2014.** - HIV associated hypocalcaemia among diarrheic patients in northwest Ethiopia: a cross sectional study. *BMC Public Health*, **14** : 679-686
- Mohapatra S., Saxena A., Gandhi G., Koner B. C. & Ray P. C., 2013.** - Vitamin D and VDR gene polymorphism (FokI) in epithelial ovarian cancer in Indian population. *Journal of Ovarian Research*, **6** : 1-6.
- Monsigny M., Duverger E. & Bourgerie S., 2004.** – Dictionnaire de biochimie moderne. Ed Ellipses, Paris. 346 p.
- Montagnier L., 1998.** - SIDA et infection par le VIH. Ed. Flammarion, Paris. 63 p.
- Moodley A., Qin M., Singh K. K. & Spector S. A., 2013.** - Vitamin D Related Host Genetic Variants Alter HIV Disease Progression in Children. *Pediatric Infectious Disease Journal*, **32** : 1230-1236
- Mora J. R., Iwata M. & von Andrian U. H., 2008.** -Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nature Reviews Immunology*, **8** : 685–698.
- Moreira-Pfrimer L. D., Pedrosa M.A., Teixeira L. & Lazaretti-Castro M., 2009.** - Treatment of vitamin D deficiency increases lower limb muscle strength in institutionalized older people independently of regular physical activity: A randomized double-blind controlled trial. *Annals of nutrition & metabolism*, **54** : 291-300.
- Mori H., Okada Y. & Tanaka Y., 2015.** - Incidence of Vitamin D Deficiency and Its Relevance to Bone Metabolism in Japanese Postmenopausal Women with Type 2 Diabetes Mellitus. *Internal medicine*, **54** : 1599-1604.
- Morrison M. A., Silveira A. C., Huynh N., Jun G., Smith S. E., Zacharaki F., Sato H., Loomis S., Andreoli M. T., Adams S. M., Radeke M. J., Jelcick A. S., Yuan Y., Tsiloulis A. N., Chatzoulis D. Z., Silvestri G., Kotoula M. G., Tsironi E. E., Hollis B. W., Chen R., Haider N. B., Miller J. W., Farrer L. A., Hageman G. S., Kim I. K., Schaumberg D. A. & DeAngelis M. M., 2011.** - Systems biology-based analysis implicates a novel role for vitamin D metabolism in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Human Genomics*, **5** : 538-568.
- Muller S. & Kappes B., 2007.** - Vitamin and co-factor biosynthesis pathways in Plasmodium and other apicomplexan parasites. *Trends in Parasitology*, **23** : 112-121.
- Munger K. L., Levin L. I., Hollis B. W., Howard N. S. & Ascherio A., 2006.** - Serum 25–hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA*, **296** : 2832-2838.

Nagy L. & Schwabe J. W., 2004. - Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends in Biochemical Sciences*, **29** : 317-324.

Nair R. & Maseeh A., 2012. - Vitamin D : The sunshine vitamin. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, **3** : 118-126.

Nakai K., Fujii H., Kono K., Goto S., Kitazawa R., Kitazawa S., Hirata M., Shinohara M., Fukagawa M. & Nishi S., 2014. - Vitamin D activates the Nrf2-Keap1 antioxidant pathway and ameliorates nephropathy in diabetic rats. *American Journal of Hypertension*, **27** : 586-595.

Neela V. S. K., Suryadevara N. C., Shinde V. G., Pydi S. S., Jain S., Jonnalagada S., Singh S. S., Valluri V. L. & Anandaraj M. P. J. S., 2015. - Association of Taq I, Fok I and Apa I polymorphisms in Vitamin D Receptor (VDR) gene with leprosy. *Human immunology*, **76** : 402-405.

Nemere I., Garbi N., Hämmerling G. J. & Khanal R. C., 2010. - Intestinal cell calcium uptake and the targeted knockout of the 1,25D3-MARRS (membrane-associated, rapid response steroid-binding) receptor/PDIA3/Erp57. *The Journal of biological chemistry*, **285** : 31859-31866.

Ngwa N. R. & Ambe A. E., 2013. - Assessment of serum calcium in relation to dietary calcium intake in a rural population in Cameroon. *Open Journal of Epidemiology*, **3** : 209-212.

Nielsen M. H., Pedersen F. S. & Kjems J., 2005. - Molecular strategies to inhibit HIV-1 replication. *Retrovirology*, **2** : 10.

Nieto G., Barber Y., Rubio M. C., Rubio M. & Fibla J., 2004. - Association between AIDS disease progression rates and the Fok-I polymorphism of the VDR gene in a cohort of HIV-1 seropositive patients. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **89-90** : 199-207.

O'Neill V., Asani F. F., Jeffery T. J., Saccone D. S. & Bornman L., 2013. - Vitamin D Receptor Gene Expression and Function in a South African Population: Ethnicity, Vitamin D and FokI. *PLoS ONE*, **8** : e67663.

Ogunkolade B. W., Boucher B. J., Prah J. M., Bustin S. A., Burrin J. M., Noonan K., North B. V., Mannan N., McDermott M. F., DeLuca H. F. & Hitman G. A., 2002. - Vitamin D Receptor (VDR) mRNA and VDR Protein Levels in Relation to Vitamin D Status, Insulin Secretory Capacity, and VDR Genotype in Bangladeshi Asians. *Diabetes*, **51** : 2294-2312.

Okazaki R., Sugimoto T., Kaji H., Fujii Y., Shiraki M., Inoue D., Endo I., Okano T., Hirota T., Kurahashi I. & Matsumoto T., 2011. - Vitamin D insufficiency defined by serum 25-

hydroxyvitamin D and parathyroid hormone before and after oral vitamin D3 load in Japanese subjects. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, **29** : 103-110.

OMS, 2013. - Lignes directrices unifiées sur l'utilisation des antirétroviraux pour le traitement et la prévention de l'infection à VIH : recommandations pour une approche de santé publique. Organisation mondiale de la Santé VIH / SIDA, Genève, Suisse, 272 p.

ONUSIDA, 2016. - Country factsheets: Côte d'Ivoire 2016. (Consulté le 10 Octobre 2016)

ONUSIDA, 2017. - Fiche d'information-journée mondiale de lutte contre le sida: statistiques mondiales et régionales sur le VIH. 8 p. (Consulté le 19 Mai 2018)

Ormerod M. G., Sun X. M., Snowden R. T., Davies R., Fearnhead H. & Cohen G. M., 1993. - Increased membrane permeability of apoptotic thymocytes : A flow cytometric study. *Cytometry*, **14** : 595 - 602.

Ormerod M. G. & Imrie P. R., 1990. - Flow cytometry. Ed. Human Press, USA. 558 p.

Ouassa T., Inwoley A., Loukou Y. C., Coulibaly E. R. D. & Combe P., 2007. - Evaluation de six tests rapides pour le dépistage des anticorps anti-VIH1 et anti-VIH2. *Journal des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques*, **8** : 57-64.

Owen D. & O'Farrell N., 2007. - Rapid HIV testing in a clinic setting. *International Journal of STD & AIDS*, **18** : 418-419.

Paltiel O., Falutz J., Veilleux M., Rosenblatt D. S. & Gordon K., 1995. - Clinical correlates of subnormal vitamin B12 concentrations in patients infected with the human immunodeficiency virus. *American Journal of Hematology*, **49** : 318-322.

Pasupathi P., Ramachandran T., Sindhu P. J., Saravanan G. & Bakthavathsalam G., 2009. - Enhanced Oxidative Stress Markers and Antioxidant Imbalance in HIV Infection and AIDS Patients. *Journal of Scientific Research*, **1** : 370 - 380.

Pawlowska E., Wysokinski D. & Blasiak J., 2016. - Nucleotide Excision Repair and Vitamin D- Relevance for Skin Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Science*, **17** : 1-20

Pedersen A. W., Helweg C. M. & Zocca M.-B., 2011. - Dendritic Cells Modified by Vitamin D: Future Immunotherapy for Autoimmune Diseases. In *Vitamins and Hormones*. Elsevier Inc., San Francisco, California, USA. **86** : 63-82.

Philippon A., 2007. - L'Infection à VIH : Aspects virologiques. Module de cours "Santé et environnement-Maladies transmissibles". Université Paris Descartes. 16 p

Pike J. W., Meyer M. B. & Bishop K. A., 2012. - Regulation of target gene expression by the vitamin D receptor - an update on mechanisms. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, **13** : 45-55.

Pirotte B.F., Rassenfosse M., Collin R., Devoeght A., Moutschen M. & Cavalier E., 2013. - rôle de la vitamine D dans l'infection par le VIH : revue des connaissances actuelles. *Revue Médicale de Liège*, **68** : 25-31.

Poitras E. & Houde A., 2002. - La PCR en temps réel : principe et application. *Review in Biology and Biotechnology*, **2** : 2-11.

Pols H. A., van Leeuwen J. P., Schilte J. P., Visser T. J. & Birkenhager J. C., 1988. - Heterologous upregulation of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor by parathyroid hormone (PTH) and PTH like peptide in osteoblast-like cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **156** : 588-594.

Post S. M., Duez H., Gervois P. P., Staels B., Kuipers F. & Princen H. M. G., 2001. - Fibrates suppress bile acid synthesis via peroxisome proliferator-activated receptor- α -mediated downregulation of cholesterol 7 α -hydroxylase and sterol 27-hydroxylase expression. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **21** : 1840-1845.

Prentice A., Schoenmakers I., Jones K. S., Jarjou L. M. & Goldberg G. R., 2009. - Vitamin D Deficiency and Its Health Consequences in Africa. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism*, **7** : 94-106.

Quinn J. M., Elliott J., Gillespie M. T. & Martin T. J., 1998. - A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation in vitro. *Endocrinology*, **139** : 4424-4427.

Raina R., Garg G., Sethi S. K., Schreiber M. J., Simon J. F. & Thomas G., 2012. - Phosphorus Metabolism. *Journal of Nephrology and Therapeutics*. **S3** : 008.

Randolph G. J., Jakubzick C. & Qu C., 2008. - Antigen Presentation by Monocytes and Monocyte-derived Cells. *Current Opinion in Immunology*, **20** : 52-60.

- Rashedi J., Asgharzadeh M., Moaddab S. R., Sahebi L., Khalili M., Mazani M., Abdolalizadeh J., 2014.** - Vitamin D Receptor Gene Polymorphism and Vitamin D Plasma Concentration: Correlation with Susceptibility to Tuberculosis. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, **5** : 607-611.
- Rasmussen H. & Craig L. C., 1959.** - Purification of parathormone by use of countercurrent distribution. *Journal of the American chemical society*, **81** : 5003-5004.
- Reiche E. M. V. & Simão A. N. C., 2011.** - The Role of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Proteins and Antiretroviral Drug Therapy in HIV-1-Induced Oxidative Stress. In: HIV and AIDS - Updates on Biology, Immunology, Epidemiology and Treatment Strategies. 41 - 69.
- Reinhardt T. A., Horst R. L. & Goff J. P., 1988.** - Calcium, phosphorus, and magnesium homeostasis in ruminants. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, **4** : 331-350.
- Richetta A. G., Silvestri V., Giancristoforo S., Rizzolo P., D'Epiro S., Graziano V., Mattozzi C., Navazio A. S., Campoli M., D'Amico C., Scarnò M., Calvieri S. & Ottini L., 2014.** - A-1012G promoter polymorphism of vitamin D receptor gene is associated with psoriasis risk and lower allele-specific expression. *DNA and Cell Biology*, **33** : 102-109.
- Rizk M. M., Zakaria N. H. & Elshazely W. G., 2014.** - Study of Vitamin D Receptor (VDR) Gene Polymorphisms among Egyptian Cohort Patients with Different Stages of Colorectal Cancer. *Journal of Cancer Therapy*, **5** : 253-263.
- Rosenvinge M. M., Gedela K., Copas A. J., Wilkinson A., Sheehy C. A., Bano G., Hay P. E., Pakianathan M. R. & Sadiq S. T., 2010.** - Tenofovir-linked hyperparathyroidism is independently associated with the presence of vitamin D deficiency. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*, **54** : 496-499.
- Ross A., Judd S., Kumari M., Hileman C., Storer N., Labbato D., Tangpricha V. & McComsey G., 2011.** - Vitamin D Linked to Carotid Intima-Media Thickness and Immune Reconstitution in HIV-Positive Individuals. *Antiviral Therapy*, **16** : 555-563.
- Rothe M., Israël N. & Barré-Sanoussi F., 1996.** - Mécanismes de la réplication virale des VIH. *Medecine Therapeutique*, **2** : 12-18.
- Ručević I., Barišić-Druško V., Glavaš-Obrovac L. & Štefanić M., 2009.** - Vitamin D Endocrine System and Psoriasis Vulgaris. *Acta dermatovenerologica Croatica*, **17** : 187-192.

- Sachidanandam R., Weissman D., Schmidt S. C., Kakol J. M., Stein L. D., Marth G. & Sherry S., 2001.** - A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, **409** : 928-933.
- Sagar N. A., Sen M. & Yadav V. K., 2015.** - Serodiagnosis of HIV by Rapid Test and ELISA Test Assay in a Tertiary Care Centre in Northern India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, **4** : 623-629
- Sai A. J., Walters R. W., Fang X. & Gallagher J. C., 2011.** - Relationship between Vitamin D, Parathyroid Hormone, and Bone Health. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **96** : E436-E446.
- Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T. & Ono M., 2008.** - Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, **133** : 775-787.
- Salimi S., Farajian-Mashhadi F., Alavi-Naini R., Talebian G. & Narooie-Nejad M., 2015.** - Association between vitamin D receptor polymorphisms and haplotypes with pulmonary tuberculosis. *Biomedical Reports*, **3** : 189-194.
- Santos A. C. O. & Almeida A. M. R., 2013.** - Nutritional status and CD4 cell counts in patients with HIV/AIDS receiving antiretroviral therapy. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **46** : 698 - 703.
- Santos E.M., Paula J.F.R., Motta P.M.C., Heinemann M.B., Leite R.C., Haddad J.P.A., Del Puerto H.L. & Reis J.K.P., 2010.** - Comparison of three methods of DNA extraction from peripheral blood mononuclear cells and lung fragments of equines. *Genetics and Molecular Research*, **9** : 1591-1598.
- Sari D. K., Damanik H. A., Lipoeto N. I. & Lubis Z., 2013.** - Is Micro Evolution in Tropical Country Women Resulting Low 25(OH)D Level? A Cross Sectional Study in Indonesia. *Journal of Nutrition Food Science*, **4** : 1-7.
- Sattentau Q. J. & Stevenson M., 2016.** - Macrophages and HIV-1 – an unhealthy constellation. *Cell Host Microbe*, **19** : 304-310.
- Schuch N. J., Garcia V. C., Vívolo S. R. G. F. & Martini L. A., 2013.** - Relationship between Vitamin D Receptor gene polymorphisms and the components of metabolic syndrome. *Nutrition Journal*, **12** : 1-96.

Semba R. D., Bartali B., Zhou J., Blaum C., Ko C. W. & Fried L. P., 2006. - Low Serum Micronutrient Concentrations Predict Frailty Among Older Women Living in the Community. *Journals of gerontology.Series A, Biological sciences and medical sciences*, **61** : 594-599.

Serrano S. C., Villareal D. G., Aguilar-Medina M., Romero-Navarro J. G., Quintana J. G. R., Meraz E. A., Ramírez I. O., Picos-Cárdenas V., Granados J., Estrada-García I., Sánchez-Schmitz G. & Ramos-Payán R., 2014. - Genetic Polymorphisms of Interleukin-1 Alpha and the Vitamin D Receptor in Mexican Mestizo Patients with Intervertebral Disc Degeneration. *International Journal of Genomics*, **2014**. DOI : 10.1155/2014/302568

Shin D. H., Martinez S. S., Parsons M., Jayaweera D. T., Campa A. & Baum M. K., 2012. - Relationship of Oxidative Stress with HIV Disease Progression in HIV/HCV Co-infected and HIV Mono-infected Adults in Miami. *International journal of bioscience, biochemistry and bioinformatics*, **2** : 217 - 223.

Shoback D., 2008. - Clinical practice. Hypoparathyroidism. *New England journal of medicine*, **359** : 391-403.

Souberbielle J. C., Body J. J., Lappe J. M., Plebani M., Shoenfeld Y., Wang T. J., Bischoff-Ferrari H. A., Cavalier E., Ebeling P. R., Fardellone P., Gandini S., Gruson D., Guérin A. P., Heickendorff L., Hollis B. W., Ish-Shalom S., Jean G., von Landenberg P., Largura A., Olsson T., Pierrot-Deseilligny C., Pilz S., Tincani A., Valcour A. & Zittermann A., 2010. - Vitamin D and musculoskeletal health, cardiovascular disease, autoimmunity and cancer: Recommendations for clinical practice. *Autoimmun Review*, **9** : 709-715.

Souberbielle J. C., Lawson-Body E. & Cormier C., 2002. - Updating about PTH: our immunoassays are not specific of the sole intact PTH. *Immune-analyze & specialized Biology*, **17** : 48-53.

Souberbielle J. C., Lawson-Body E., Hammadi B., Sarfati E., Kahan A. & Cormier C., 2003. - The use in clinical practice of parathyroid hormone normative values established in vitamin D-sufficient subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **88** : 3501-3504.

Souberbielle J. C., Prié D., Courbebaisse M., Friedlander G., Houillier P., Maruani G., Cavalier E. & Cormier C., 2008. - Update on vitamin D and evaluation of vitamin D status. *Annales d'Endocrinologie*, **69** : 501-510.

Stack B. C. & Randolph G., 2010. - Parathyroid disease : Investigations. In : A Practical Manual of Thyroid and Parathyroid Disease. Eds. Wiley-Blackwell, Chichester, UK.164-173.

Stearns M. & Cox J., 2010. - Parathyroid disease : Symptoms, differential diagnosis, and management. In : A Practical Manual of Thyroid and Parathyroid Disease. Eds. Wiley- Blackwell, Chichester, UK, 145-163.

Stein E. M., Yin M. T., McMahon D. J., Shu A., Zhang C. A., Ferris D. C. & Shane E., 2011. - Vitamin D deficiency in HIV-infected postmenopausal Hispanic and African-American women. *Osteoporosis International*, **22** : 477-487.

Stone B., Dockrell D., Bowman C. & McCloskey E., 2010. - HIV and bone disease – review. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **503** : 66-77.

Suneetha P. V., Sarin S. K., Goyal A., Kumar G. T., Shukla D. K. & Hissar S., 2006. - Association between vitamin D receptor, CCR5, TNF- α and TNF- β gene polymorphisms and HBV infection and severity of liver disease. *Journal of Hepatology*, **44** : 856-863.

Suresh D. R., Annam V., Pratibha K. & Prasad B. V. M., 2009. - Total antioxidant capacity – a novel early bio-chemical marker of oxidative stress in HIV infected individuals. *Journal of Biomedical Science*, **16** : 61.

Teske K., Nandhikonda P., Bogart J. W., Feleke B., Sidhu P., Yuan N. Y., Preston J., Goy R., Han L., Silvaggi N. R., Singh R. K., Bikle D. D., Cook J. M. & Arnold L. A., 2014. - Identification of VDR Antagonists among Nuclear Receptor Ligands Using Virtual Screening. *Nuclear Receptor Research*, **1** : 101076.

Thakkestian A., D'Este C., Eisman J., Nguyen T. & Attia J., 2004. - Meta-analysis of molecular association studies: vitamin D receptor gene polymorphisms and BMD as a case study. *Journal of Bone and Mineral Research*, **19** : 419- 428.

Theodorou M., Sersté T., Van Gossom M. & Dewit S., 2014. - Factors associated with vitamin D deficiency in a population of 2044 HIV-infected patients. *Clinical Nutrition*, **33** : 274-279.

Thibeault D., Caron N., Djiana R., Kremer R. & Blank D., 2012. - Development and optimization of simplified LC–MS/MS quantification of 25-hydroxyvitamin D using protein precipitation combined with online solid phase extraction (SPE). *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical Life Sciences*, **883-884** : 120-127.

Tissandié E., Guéguen Y., Lobaccaro J-M. A., Aigueperse J. & Souidi M., 2006. - Vitamine D : métabolisme, régulation et maladies Associées. *Medecine/Sciences*, **22** : 1095-1100.

- Torres C., de la Torre M. S., Carcia-Moruja C. & Carrero A. J., 2010.** - Immunophenotype of vitamin D receptor polymorphism associated to risk of HIV-1 infection and rate of disease progression. *Current HIV research*, **8** : 487-492.
- Turpeinen U., Hohenthal U. & Stenman U.-H., 2003.** - Determination of 25-Hydroxyvitamin D in Serum by HPLC and Immunoassay. *Clinical Chemistry*, **49** : 1521-1524.
- Uitterlinden A. G., Fang Y., Van Meurs J. B., Pols H. A. & Van Leeuwen J. P., 2004b.** - Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*, **338** : 143-156.
- Uitterlinden A. G., Fang Y., van Meurs J. B., van Leeuwen H. & Pols H. A., 2004a.** - Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to Vitamin D related disease states. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **89-90** : 187-193.
- UNAIDS, 2013a.** Global Report Epidemiology Slides, In Core Epidemiology Slides, Geneva, World Health Organization. 274 p.
- UNAIDS, 2013b.** Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic. Geneva. 198 p.
- UNAIDS, 2016.** - Country factsheets Côte d'Ivoire 2016 : HIV and AIDS Estimates. 7 p. (Consulté le 14/10/2017)
- Valdivielso J. M. & Fernandez E., 2006.** - Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clinica Chimica Acta*, **371** : 1-12
- van Etten E., Verlinden L., Giulietti A., Ramos-Lopez E., Branisteanu D. D., Ferreira G. B., Overbergh L., Verstuyf A., Bouillon R., Roep B. O., Badenhoop K. & Mathieu C., 2007.** - The vitamin D receptor gene FokI polymorphism: functional impact on the immune system. *European Journal of Immunology*, **37 (2)** : 395-405.
- van Schoor N. M. & Lips P., 2011.** Worldwide vitamin D status. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, **25** : 671-680.
- Vaubourdolle M., 2007.** - Toxicologie, sciences mathématiques physiques et chimiques. 3^{ème} édition, Paris. 1023.
- Viallard J. F., Blanco P., André M., Etienne G., Liferman F., Neau D., Vidal E., Moreau J. F. & Pellegrin J. L., 2006.** - CD8+HLA-DR+ T lymphocytes are increased in common variable immunodeficiency patients with impaired memory B-cell differentiation. *Clinical Immunology*, **119** : 51-58.

- Viard J. P., 2015.** - Vitamine D et pathologies infectieuses. *Medecine Nucleaire*, **39** : 430-434.
- Waki K. & Freed E. O., 2010.** - Macrophages and Cell-Cell Spread of HIV-1. *Viruses*, **2** : 1603-1620.
- Wall J. D. & Pritchard J. K., 2003.** - Assessing the performance of the haplotype block model of linkage disequilibrium. *American Journal of Human Genetics*, **73** : 502-515.
- Wang D. G., Fan J. B., Siao C. J., Berno A., Young P., Sapolsky R., Ghandour G., Perkins N., Winchester E., Spencer J., Kruglyak L., Stein L., Hsie L., Topaloglou T., Hubbell E., Robinson E., Mittmann M., Morris M. S., Shen N., Kilburn D., Rioux J., Nusbaum C., Rozen S., Hudson T. J., Lipshutz R., Chee M. & Lander E. S., 1998.** - Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*, **280** : 1077-1082.
- Wang T. J., Zhang F., Richards J. B., Kestenbaum B., van Meurs J. B., Berry D., Kiel D. P., Streeten E. A., Ohlsson C., Koller D. L., Peltonen L., Cooper J. D., O'Reilly P. F., Houston D. K., Glazer N. L., Vandenput L., Peacock M., Shi J., Rivadeneira F., McCarthy M. I., Anneli P., de Boer I. H., Mangino M., Kato B., Smyth D. J., Booth S. L., Jacques P. F., Burke G. L., Goodarzi M., Cheung C.-L., Wolf M., Rice K., Goltzman D., Hidiroglou N., Ladouceur M., Wareham N. J., Hocking L. J., Hart D., Arden N. K., Cooper C., Malik S., Fraser W. D., Hartikainen A.-L., Zhai G., Macdonald H. M., Forouhi N. G., Loos R. J. F., Reid D. M., Hakim A., Dennison E., Liu Y., Power C., Stevens H. E., Jaana L., Vasan R. S., Soranzo N., Bojunga J., Psaty B. M., Lorentzon M., Foroud T., Harris T. B., Hofman A., Jansson J.-O., Cauley J. A., Uitterlinden A. G., Gibson Q., Järvelin M.-R., Karasik D., Siscovick D. S., Econs M. J., Kritchevsky S. B., Florez J. C., Todd J. A., Dupuis J., Hyppönen E. & Spector T. D., 2010.** - Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome wide association study. *Lancet*, **376** : 180-188.
- Waterhouse J. C., Perez T. H. & Albert P. J., 2009.** - Reversing bacteria-induced 25-hydroxyvitamin D receptor dysfunction is key to autoimmune disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1173** : 757-765.
- Welch R. & Graham R. D., 2004.** - Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *Journal of Experimental Botany*, **55** : 353-364

- Welz T., Childs K., Ibrahim F., Poulton M., Taylor C. B., Moniz C. F. & Post F. A., 2010.** - Efavirenz is associated with severe Vitamin D deficiency and increased alkaline phosphatase. *AIDS*, **24** : 1923-1928.
- White J. H., 2008.** - Vitamin D Signaling, Infectious Diseases and Regulation of Innate Immunity. *American Society for Microbiology*, **76** : 3837-3843.
- White J. H., 2012.** - Regulation of intracrine production of 1,25-dihydroxyvitamin D and its role in innate immune defense against infection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **523** : 58-63.
- Whitfield G. K., Remus L. S., Jurutka P.W., Zitzer H., Oza A. K., Dang H. T., Haussler C. A., Galligan M. A., Thatcher M. L., Dominguez E. C. & Haussler M. R., 2001.** - Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **177** : 145-159.
- WHO, 2005.** - Determine HIV Rapid Test (For use with whole blood, serum, or plasma Store kit : 2 - 30° C), Geneva, World Health Organization, 1 p.
- WHO, 2008.** - Revised Surveillance Case Definitions for HIV Infection among Adults, Adolescents, and Children Aged < 18 Months and for HIV Infection and AIDS Among Children Aged 18 Months to < 13 Years - United States. *MMWR* 57/RR – 10. 16 p.
- WHO, 2013.** - World Health Organization: Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. Recommendations for a public health approach, Geneva, World Health Organization. 273 p.
- WHO, 2016.** - Global Report UNAIDS, report on the global AIDS epidemic 2016-2021, Geneva 27, Switzerland. 16 p.
- WHO, 2017.** Global Report UNAIDS, report on the global AIDS epidemic 2016 - 2021, Geneva 27, Switzerland. 16p.
- WHO/UNAIDS, 2011.** - World Health Organization, UNAIDS, UNICEF. La riposte mondiale au VIH/sida : le point sur l'épidémie et sur les progrès du secteur de santé vers un accès universel: 2011 rapport de situation. Genève : Organisation mondiale de la Santé. viii, 225 p.
- Wilson E. M. P. & Sereti I., 2013.** - Immune restoration after antiretroviral therapy: the pitfalls of hasty or incomplete repairs. *Immunological Reviews*, **254** : 343-354.

- Wintergerst E. S., Maggini S. & Hornig D. H., 2007.** - Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. *Annals of Nutrition and Metabolism*, **51** : 301-323.
- Witham M. D., Nadir M. A. & Struthers A. D., 2009.** - Effect of vitamin D on blood pressure: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Hypertension*, **27** : 1948-1954.
- Wohl D. A., Orkin C., Doroana M., Pilotto J. H., Sungkanuparph S., Yeni P., Vanveggel S., Deckx H. & Boven K., 2014.** - Change in vitamin D levels and risk of severe vitamin D deficiency over 48 weeks among HIV-1-infected, treatment-naive adults receiving rilpivirine or efavirenz in a Phase III trial (ECHO). *Antiviral Therapy*, **19** : 191-200.
- Woods M. N., Tang A. M., Forester J., Jones C., Hendricks K., Ding B. & Knox T. A., 2003.** - Effect of dietary intake and protease inhibitors on serum vitamin B12 levels in a cohort of human immunodeficiency virus-positive patients. *Clinical Infectious Diseases*, **37** : 124–131.
- Wuerzner G. M. B. & Waeber B., 2011.** - Hypertension and vitamin D: not again. *Revue Médicale Suisse*, **7** : 121-124.
- Yamamoto N., Ushijima N. & Koga Y., 2009.** - Immunotherapy of HIV-infected patients with GC Protein-derived Macrophage Activating Factor (GcMAF). *Journal of medical Virology*, **81** : 16-26.
- Yapo A. E., Assayi M., Aka N. B., Bonetto R., Comoe L., Lonsdorfer A., Monnet D. & Diaine C., 1990.** - Les valeurs de référence de 21 constituants biochimiques sanguins de l'ivoirien adulte présumé sain. *Publications Médicales Africaines*, **110** : 49-57.
- Yasuda H., Shima N., Nakagawa N., Yamaguchi K., Kinosaki M., Mochizuki S. I., Tomoyasu A., Yano K., Goto M., Murakami A., Tsuda E., Morinaga T., Higashio K., Udagawa N., Takahashi N. & Suda T., 1998.** - Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95** : 3597-3602.
- Yilma D., Kæstel P., Olsen M. F., Abdissa A., Tesfaye M., Girma T., Krarup H., Mølgaard C., Michaelsen K. F., Ritz C., Kirk O., Andersen Å. B. & Friis H., 2016.** - Change in serum 25-hydroxyvitamin D with antiretroviral treatment initiation and nutritional intervention in HIV-positive adults. *British Journal of Nutrition*, **116** : 1720-1727.
- Yilmaz A., 2007.** - Antiretroviral treatment of HIV-1 in the central nervous system. Vasastadens Bokbinderi AB, Göteborg, Sweden, 60 p.

Yin M. & Stein E., 2011. - The Effect of Antiretrovirals on Vitamin D. *Clinical Infectious Diseases*, **52** : 406-408.

Younus A., Faiz M. & Yasmeen A., 2017. - Association of Vitamin D Receptor FokI and TaqI Gene Polymorphisms in Pakistani Women with 25(OH)D Levels. *Journal of Food and Nutrition Research*, **5** : 475-480.

Zabel B. U., Kronenberg H. M., Bell G. I. & Shows T. B., 1985. - Chromosome mapping of genes on the short arm of human chromosome 11: parathyroid hormone gene is at 11p15 together with the genes for insulin, c-Harvey-ras 1, and beta hemoglobin. *Cytogenetic and Genome Research*, **39** : 200-205.

Zaman Z., Fielden P. & Frost P. G., 1993. - Simultaneous determination of vitamins A and E and carotenoids in plasma by reversed-phase HPLC in elderly and younger subjects. *Clinical Chemistry*, **39** : 2229-2234.

Zhang H. S., 2009. - Nrf2 is involved in inhibiting Tat-induced HIV-1 long terminal repeat transactivation. *Free Radical Biology & Medicine*, **47** : 261-268.

Zhang R. & Naughton D. P., 2010. - Vitamin D in health and disease: Current perspectives. *Nutrition Journal*, **9** : 1-13.

Zhang L., Yin X., Wang J., Xu D., Wang Y., Yang J., Tao Y., Zhang S., Feng X. & Yan C., 2018. - Associations between VDR Gene Polymorphisms and Osteoporosis Risk and Bone Mineral Density in Postmenopausal Women : *A systematic review and MetaAnalysis Scientific Reports*, **8** : 981.

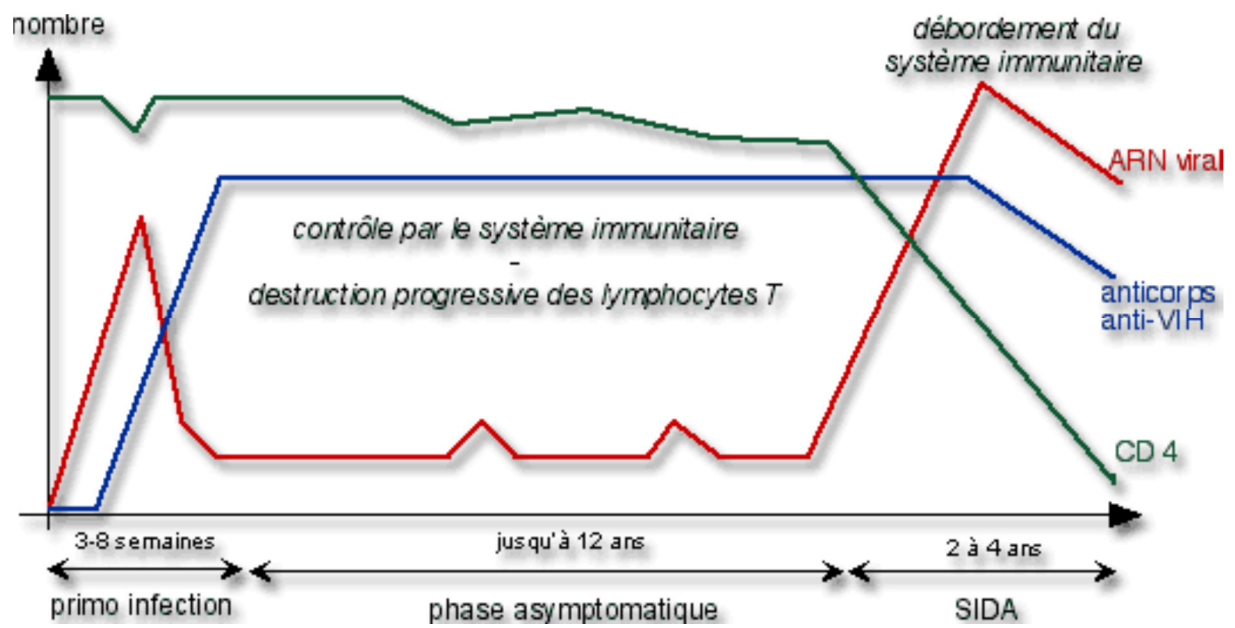
Zineb R., Zhor B., Odile W. & Marthe R. R., 1998. - Distinct, tissue-specific regulation of vitamin D receptor in the intestine, kidney, and skin by dietary calcium and vitamin D. *Endocrinology*, **139** : 1844-1852.

Zittermann A. & Gummert J. F., 2010. - Nonclassical vitamin D action. *Nutrients*, **2** : 408-425.

Zmuda J. M., Cauley J. A. & Ferrel R. E., 2000. - Molecular Epidemiology of Vitamin D Receptor Gene Variants. *Epidemiologic Reviews*, **22** : 203-217.

ANNEXES

ANNEXE 1



Evolution des paramètres virologique et immunologique au cours de l'infection à VIH (Fener et Criton, 2007)

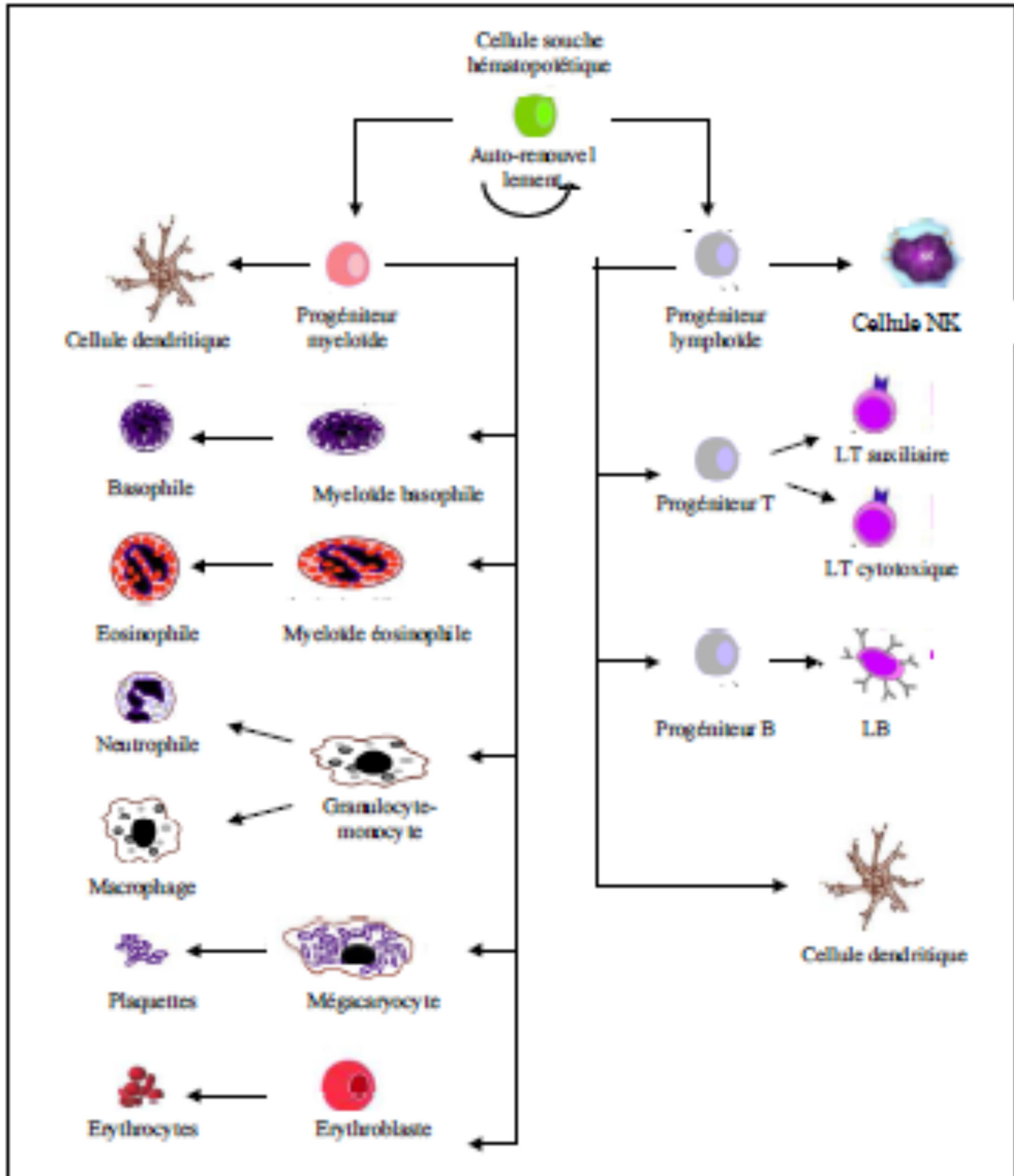
ANNEXE 2

Classes des Antirétroviraux (Haidara, 2012)

Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI)	Inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI)	Inhibiteur de la protéase (IP)	Inhibiteurs de fusion	Inhibiteurs d'entrée	Inhibiteurs d'Intégrase
Zidovudine* (AZT) 1987	Nevirapine* (NVP) 1996	Saquinavir (SQV) 1995	Enfuvirtide (ENF) 2003	Maraviroc (MVC) 2007	Raltégrav* (RAL) 2007
Didanosine* (ddl) 1991	Delavirdine (DLV) 1997	Ritonavir* (RTV) 1996			
Stavudine* (d4T) 1994	Efavirenz* (EFV) 1998	Indinavir (IDV) 1996			
Lamivudine* (3TC) 1995	Etravirine* (ETV) 2008	Nelfinavir (NFV) 1997			
Abacavir* (ABC) 1998		Lopinavir/Ritonavir* (LPV / RTV) 2000			
Tenofovir* (TDF) 2001		Atazanavir* (ATV) 2003			
Emtricitabine* (FTC) 2003		Fosamprenavir (FPV) 2003			
		Tipranavir (TPV) 2005			
		Darunavir* (DRV) 2006			

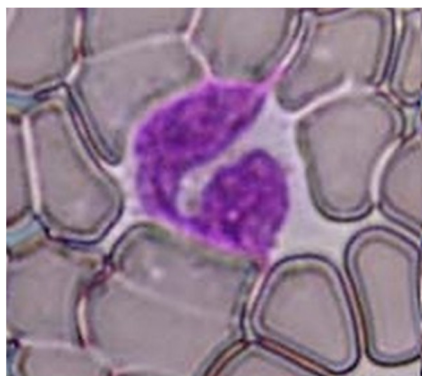
*ARV retenus

ANNEXE 3

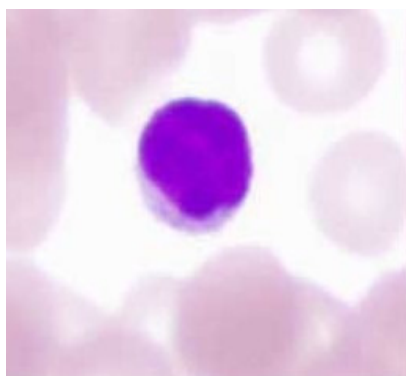


Les composants cellulaires du système immunitaire (Bergereau, 2010)

ANNEXE 4



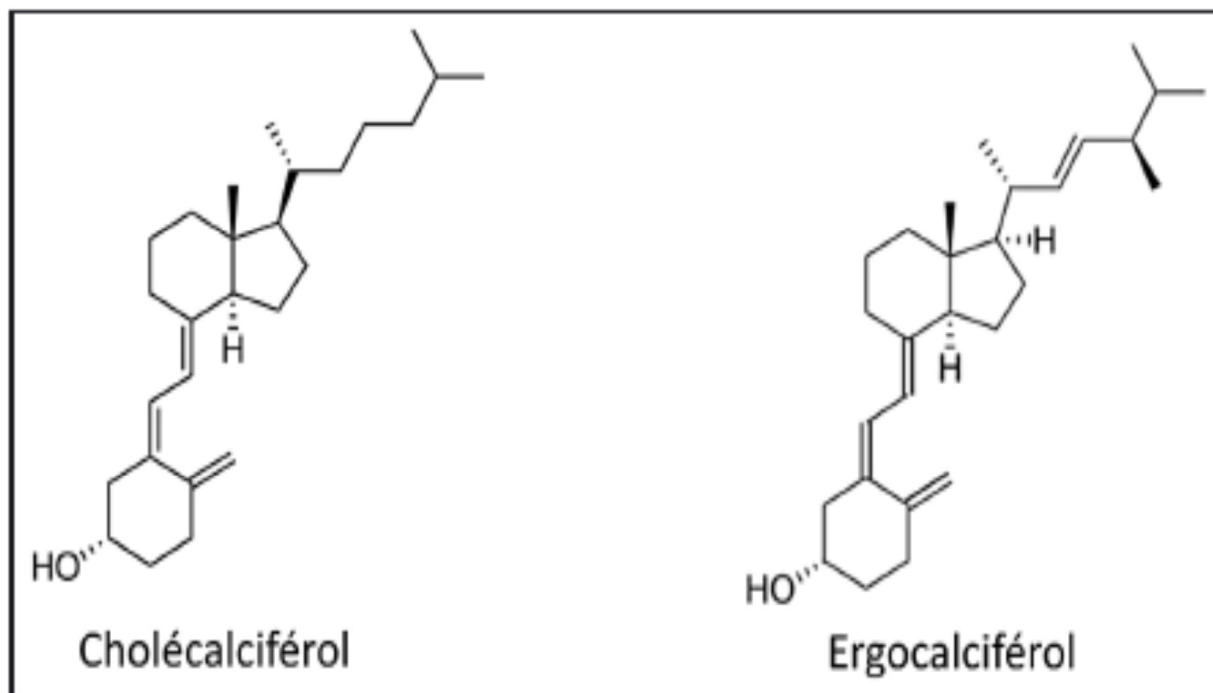
Monocyte en microscopie optique (**Feng *et al.*, 2011**)



Lymphocytes en microscopie optique (**Viallard *et al.*, 2006**)

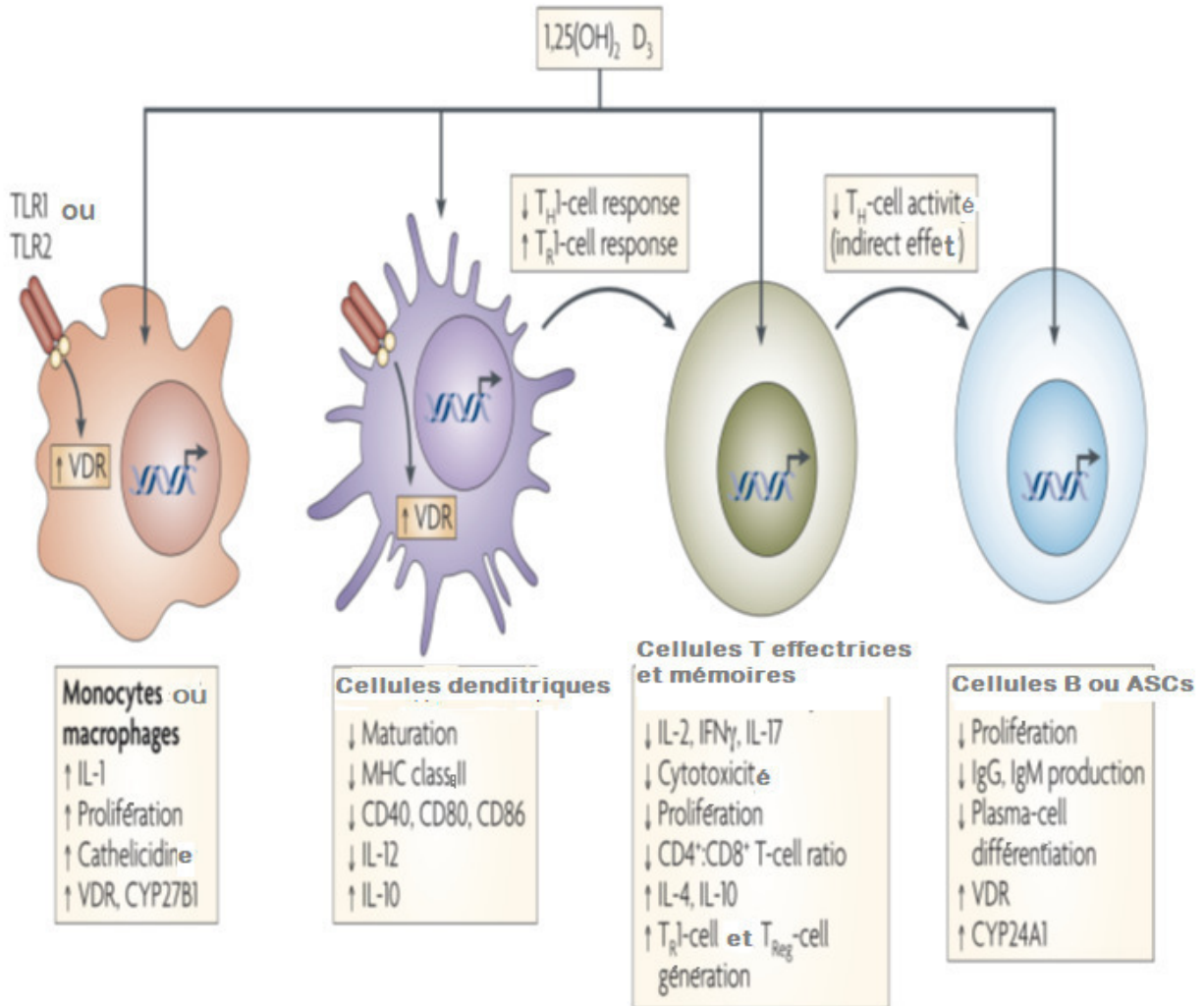
Cellules participant à la défense immunitaire de l'organisme humain

ANNEXE 5



Structure du Cholécalférol (D₃) et de l'ergocalciférol (D₂) (Landrier, 2014)

ANNEXE 6



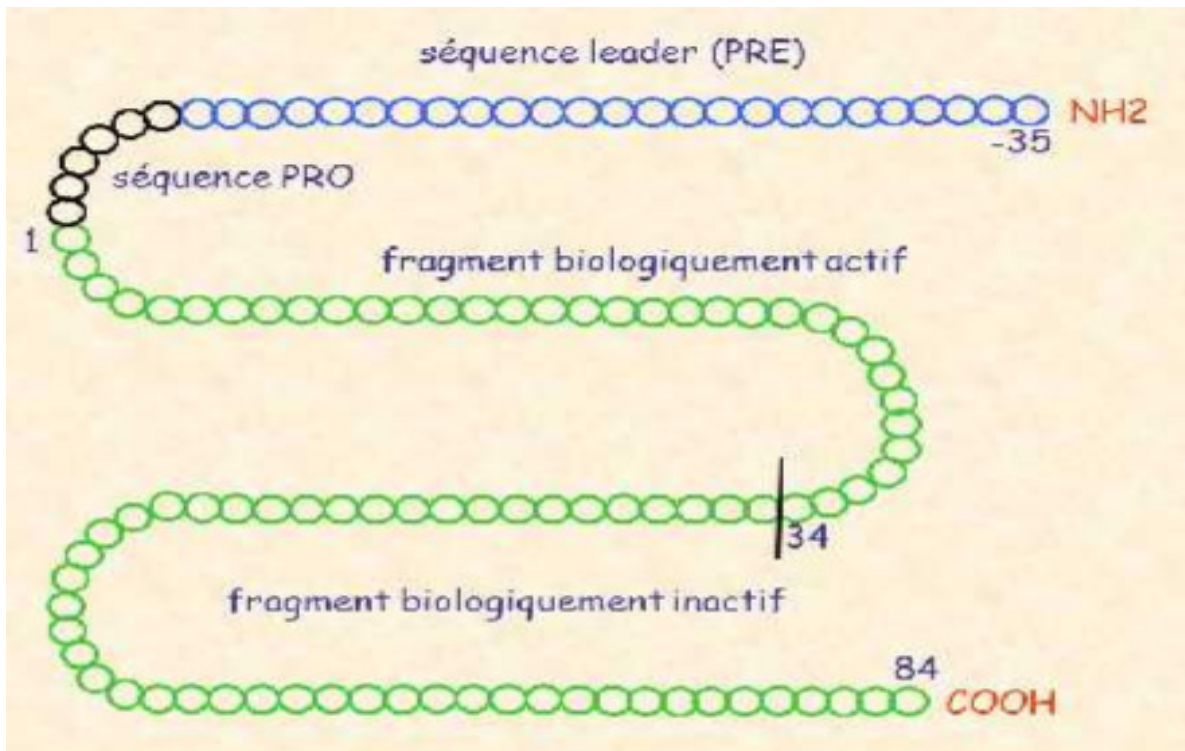
Mécanismes de l'immunomodulation de la vitamine D₃ (Bikle, 2011)

ANNEXE 7



Chaîne HPLC (Waters[®], France) (Photographie Aké Aya Jeanne A., 2016, IPCI-Cocody)

ANNEXE 8



Structure de la PTH (Houillier, 2008)

ANNEXE 9

Notice d'information

Titre de l'étude : Statut en vitamine D et polymorphisme du gène du récepteur de la vitamine D des personnes vivant avec le virus de l'immunodéficience humaine (PVVIH) en Côte d'Ivoire

Etudiante : AKE Aya Jeanne Armande

Promoteurs : Pr DJAMAN Allico Joseph, Pr YAPO Adou Francis, Dr BOYVIN Lydie, Dr SERI Kipré Laurent

But :

Dans le cadre de notre travail de Thèse de l'Université Félix Houphouët-Boigny, nous réalisons une étude qui a pour objectif : Analyser le polymorphisme allélique du VDR en relation avec les concentrations en 25-hydroxyvitamine D₃ pour le déficit en vitamine D₃ afin d'une meilleure prise en charge des personnes vivant avec le VIH (PVVIH).

Procédures :

Pour réaliser ce travail, nous allons vous prélever 3 tubes de sang et dans chaque tube nous allons prendre 3 cuillères à café. Ce sang va être utilisé pour doser la créatinine, l'urée, le calcium, le phosphore, le magnésium, la 25-hydroxyvitamine D₃, la parathormone et déterminer l'activité de l'Alanine aminotransférase et de la phosphatase alcaline, puis faire la numération des lymphocytes T CD4⁺ et l'étude moléculaire du gène du récepteur de la vitamine D afin de voir son implication dans le déficit en 25-hydroxyvitamine D₃.

Risques :

Le prélèvement peut entraîner des risques notamment une douleur au point de piqûre et un petit gonflement (inflammation), pour minimiser ces risques, le prélèvement sera fait par du matériel stérile et des techniciens certifiés.

Avantages :

La connaissance des paramètres biochimiques, du statut en 25-hydroxyvitamine D₃ et l'étude du polymorphisme du gène du récepteur de la vitamine D, nous permettra de mieux vous prendre en charge et aussi les autres participants atteints du VIH.

Participation volontaire :

Vous êtes libre d'accepter ou de ne pas accepter de participer à ce travail. Si vous refusez, vous ne courez aucun préjudice et vous serez traité comme auparavant.

Personnes à contacter :

AKE Aya Jeanne Armande Tél : 06 41 77 61

Abidjan, le

Formulaire de consentement éclairé

Titre de l'étude : Statut en vitamine D et polymorphisme du gène du récepteur de la vitamine D des personnes vivant avec le virus de l'immunodéficience humaine (PVVIH) en Côte d'Ivoire

Etudiante: AKE Aya Jeanne Armande

Promoteurs: Pr DJAMAN Allico Joseph, Pr YAPO Adou Francis, Dr BOYVIN Lydie, Dr SERI Kipré Laurent

Résumé de l'objectif de la recherche : Cette étude est réalisée afin d'analyser le polymorphisme allélique du VDR en relation avec les concentrations en 25-hydroxyvitamine D₃ pour le déficit en vitamine D₃ afin d'une meilleure prise en charge des personnes vivant avec le VIH (PVVIH).

1. Je soussigné,.....déclare avoir lu le document d'information et accepte de participer à l'étude de **AKE Aya Jeanne Armande**.
2. J'ai reçu une explication concernant la nature, le but, la durée de l'étude et j'ai été informé de ce qu'on attend de ma part. On m'a remis une copie de ce formulaire de consentement éclairé, signé et daté, précédé d'un résumé de l'objectif de la recherche.
3. Je suis libre de participer ou non, de remplir le questionnaire, complètement ou non, d'abandonner ma participation à l'étude à tout moment sans qu'il soit nécessaire de justifier ma décision et sans que cela n'entraîne le moindre désavantage pour moi.
4. Les catégories de données qui seront utilisées dans le cadre de cette étude sont :
 - les réponses que j'ai données aux questionnaires de l'enquête
 - les résultats que j'obtiendrai aux différents tests pratiqués
5. J'accepte que ces données fassent l'objet de traitements ultérieurs à des fins scientifiques, en relation directe avec les objectifs de la recherche ci-dessus mentionnés, dans le respect de la loi relative à la protection de la vie privée à l'égard des traitements de données à caractère personnel. Mon nom, les réponses aux questionnaires et mes informations personnelles seront gardés confidentiels. Les responsables scientifiques de cette étude et les personnes qui traiteront les données s'engagent à respecter cette confidentialité de données.
6. J'accepte que les résultats de cette étude, qui seront toujours anonymes, soient diffusés à des fins scientifiques et en respectant les règles déontologiques de la communauté scientifique.
7. Je peux à tout moment demander la consultation des données à caractère personnel collectées ou leur rectification sans frais. Ces données seront conservées durant le temps nécessaire à leur analyse et ce, jusqu'à un maximum de dix années. Les responsables du traitement de ces données (**Pr DJAMAN A. Joseph, Pr YAPO A. Francis, Dr BOYVIN Lydie, Dr SERI Kipré Laurent, AKE Aya Jeanne Armande**) peuvent être contactés à l'adresse suivante : (**Département de Biochimie Clinique et Fondamentale de l'Institut Pasteur de Cocody**).
8. Je consens de mon plein gré à participer à cette étude.

Nous vous remercions d'apposer la mention « lu et approuvé ».

Signature du participant

Signature du témoin

Date (jour/mois/année)

Je confirme que j'ai expliqué la nature, le but et la durée de l'étude au participant mentionné ci-dessus.
Le sujet confirme son accord de participation par sa signature personnelle datée.

Signature de la personne qui procure l'information (étudiant/doctorant)

Date (jour/mois/année)

Questionnaire santé et soins médicaux

Commune : Centre :

N° Identifiant :

Date de naissance :

Age : |__| |__| |__| ans Sexe: M / F |__| |__| |__| |__| |__| |__|

Taille : _____ m Poids : _____ kg

Teint : Célibataire Marié(e)

Profession : Ethnie :

Qui remplit ce questionnaire?

La **personne** dont le **numéro identifiant** figure **ci-dessus**.

Si cela n'est pas possible, une autre personne témoin peut remplir ce questionnaire mais toujours pour la personne citée ci-dessus.

Dans tous les cas, merci d'indiquer ci-dessous : **Le Nom et Prénoms de la personne qui remplit ce questionnaire** :

Date à laquelle vous remplissez ce questionnaire :

|__| |__| |__| |__| |__| |__|

Jour mois année

Comment remplir ce questionnaire?

En cochant pour chaque question la case correspondant à votre réponse, comme par exemple :

Souffrez-vous d'une maladie ou d'un problème de santé chronique?

1- oui

2- non

3- ne sais pas

Vos réponses à ce questionnaire seront traitées de façon anonyme. Votre participation n'est pas obligatoire mais elle contribuera à une meilleure connaissance de l'état de santé de la population.

Comment est votre état de santé général?

1- très bon

2- bon

3- moyen

4- mauvais

5- très mauvais

Quand remonte votre première consultation?

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Jour

mois

année

Quand remonte votre dernière consultation?

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Jour

mois

année

Consommez-vous de l'alcool?

1- oui

2- non

3- ne sais pas

Est-ce que vous fumez?

1- oui

2- non

3- ne sais pas

Etes-vous sous traitement vitaminique?

1- oui

2- non

3- ne sais pas

Etes-vous sous un autre traitement vitaminique?

1- oui

2- non

3- ne sais pas

Etes-vous sous traitement antirétroviral? Si oui lequel?

1- oui

2- non

3- ne sais pas

Souffrez-vous d'une autre maladie ou d'un problème de santé chronique? Si oui (la) lequel(le)?

1- oui

2- non

3- ne sais pas

Date : _____ / _____ / _____

Signature du participant :

ANNEXE 10



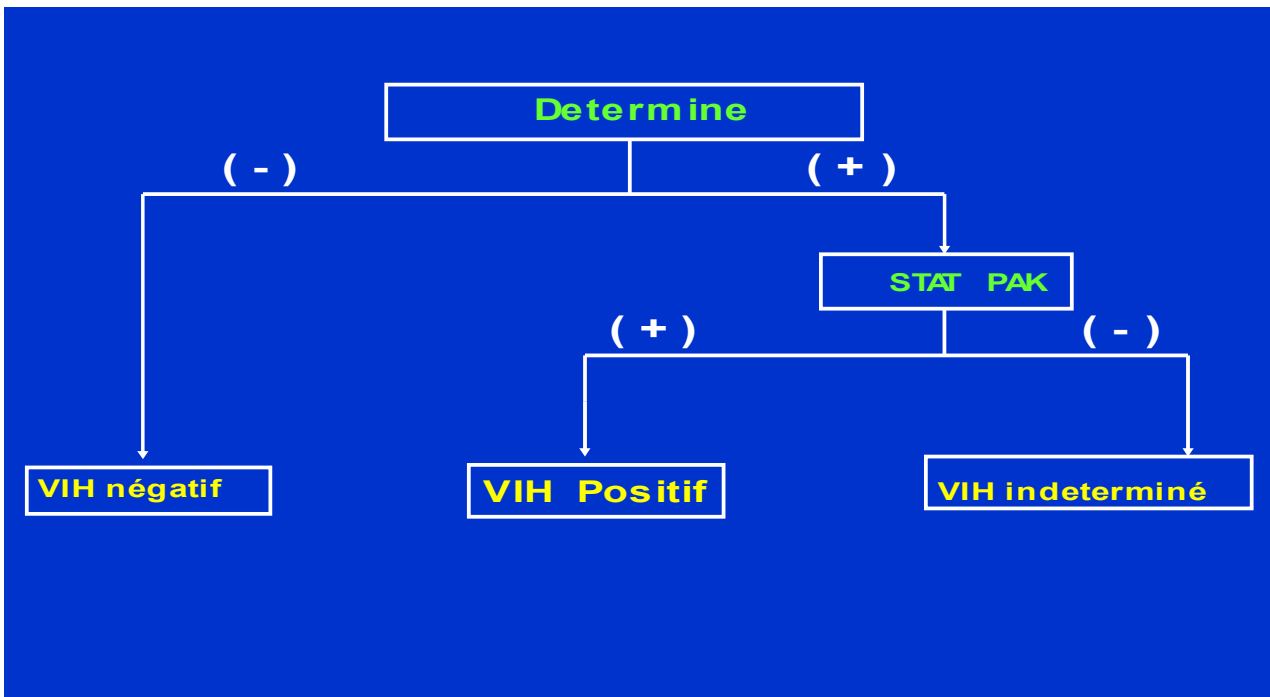
Cytomètre en flux (BD FACSCalibur) (Photographie Aké Aya Jeanne A., 2015, IPCI-Cocody)

ANNEXE 11

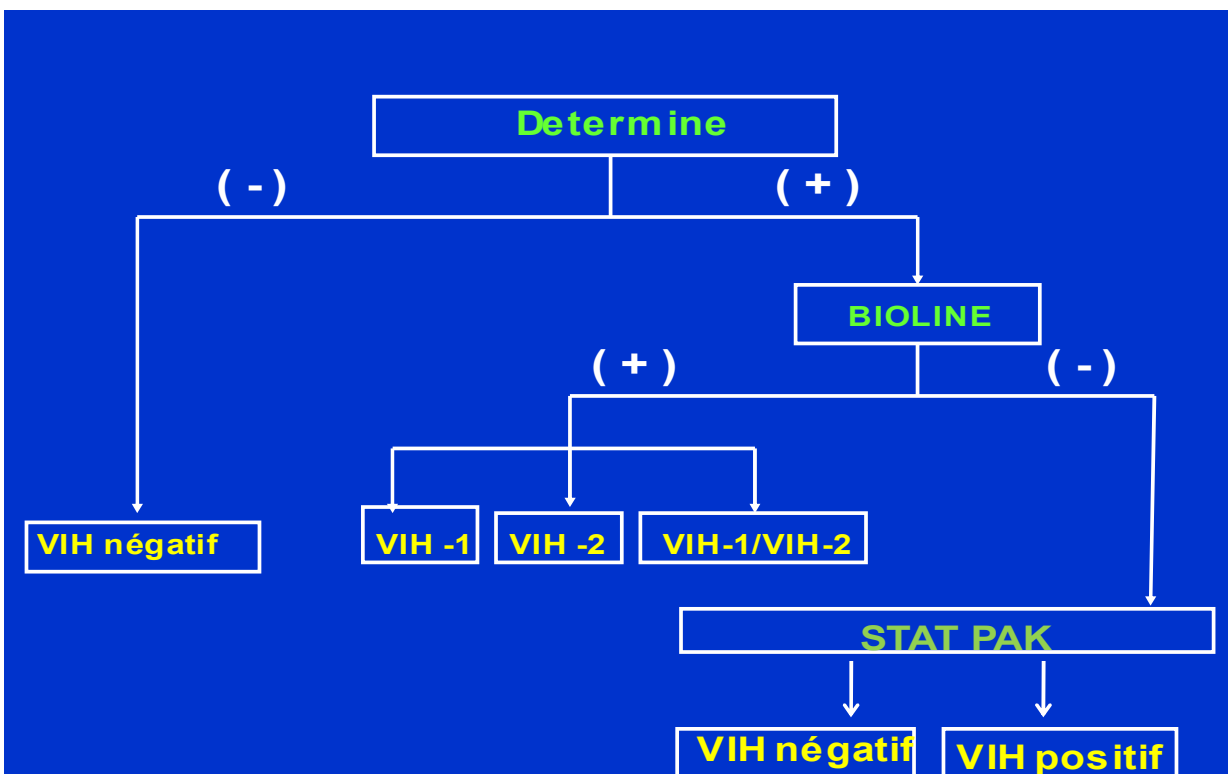


Cobas C311 (Roche, France) (Photographie Aké Aya Jeanne A., 2015, IPCI-Cocody)

ANNEXE 12



Algorithme de tests rapides en Série en Côte d'Ivoire au centre de dépistage volontaire (CDV)



Algorithme de tests rapides en Série en Côte d'Ivoire au laboratoire

ANNEXE 13

Stades cliniques de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et (CDC) (WHO, 2008)

WHO stage [†]	WHO T-lymphocyte count and percentage [‡]	CDC stage [¶]	CDC T-lymphocyte count and percentage
Stage 1 (HIV infection)	CD4+ T-lymphocyte count of ≥ 500 cells/ μ L	Stage 1 (HIV infection)	CD4+ T-lymphocyte count of ≥ 500 cells/ μ L or CD4+ T-lymphocyte percentage of ≥ 29
Stage 2 (HIV infection)	CD4+ T-lymphocyte count of 350–499 cells/ μ L	Stage 2 (HIV infection)	CD4+ T-lymphocyte count of 200–499 cells/ μ L or CD4+ T-lymphocyte percentage of 14–28
Stage 3 (advanced HIV disease [AHD])	CD4+ T-lymphocyte count of 200–349 cells/ μ L	Stage 2 (HIV infection)	CD4+ T-lymphocyte count of 200–499 cells/ μ L or CD4+ T-lymphocyte percentage of 14–28
Stage 4 (acquired immunodeficiency syndrome [AIDS])	CD4+ T-lymphocyte count of < 200 cells/ μ L or CD4+ T-lymphocyte percentage of < 15	Stage 3 (AIDS)	CD4+ T-lymphocyte count of < 200 cells/ μ L or CD4+ T-lymphocyte percentage of < 14

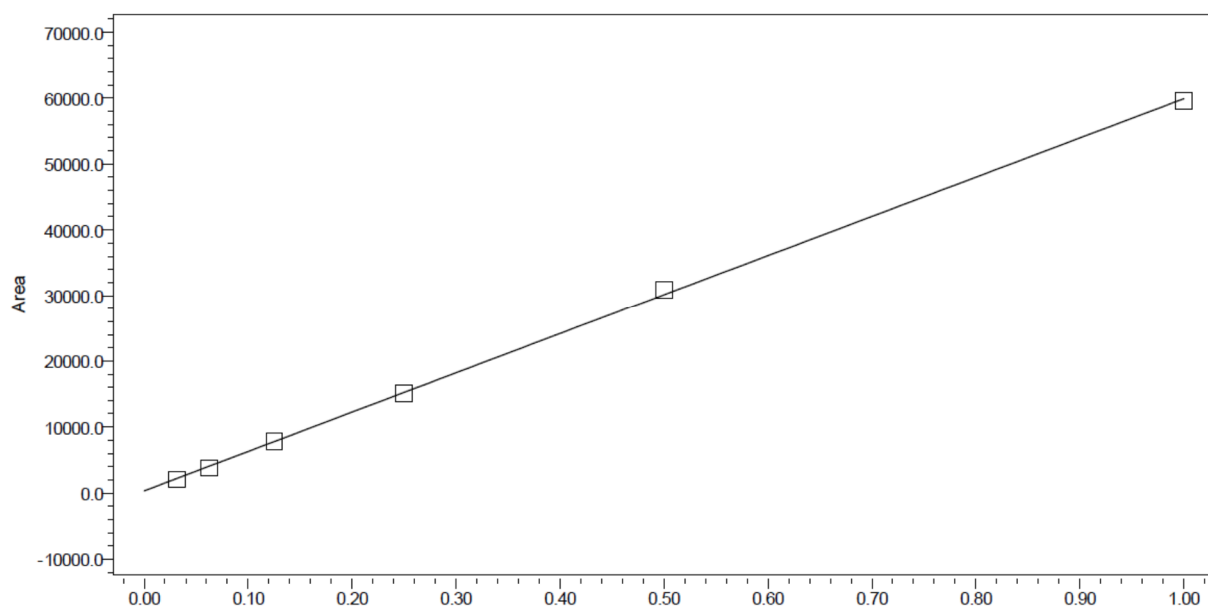
* For reporting purposes only.

† Among adults and children aged ≥ 5 years.

‡ Percentage applicable for stage 4 only.

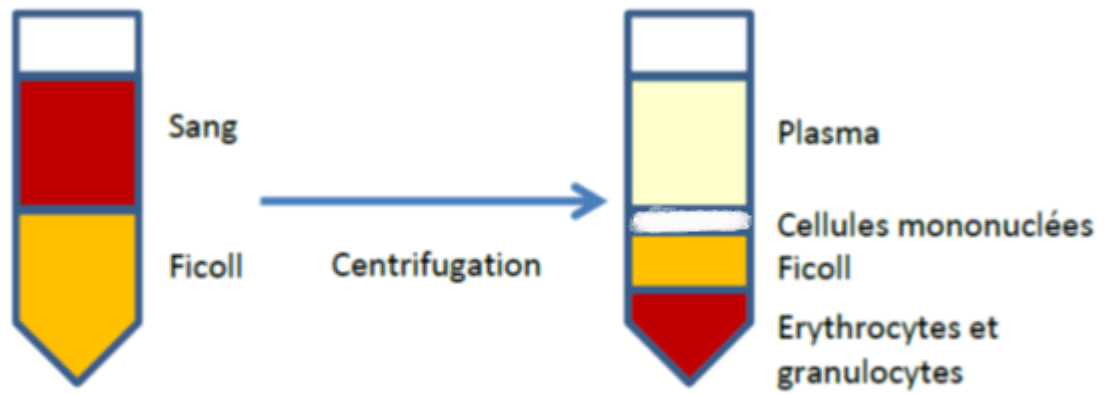
¶ Among adults and adolescents (aged ≥ 13 years). CDC also includes a fourth stage, stage unknown: laboratory confirmation of HIV infection but no information on CD4+ T-lymphocyte count or percentage and no information on AIDS-defining conditions.

ANNEXE 14



Droite d'étalonnage de la 25-hydroxyvitamine D₃

ANNEXE 15



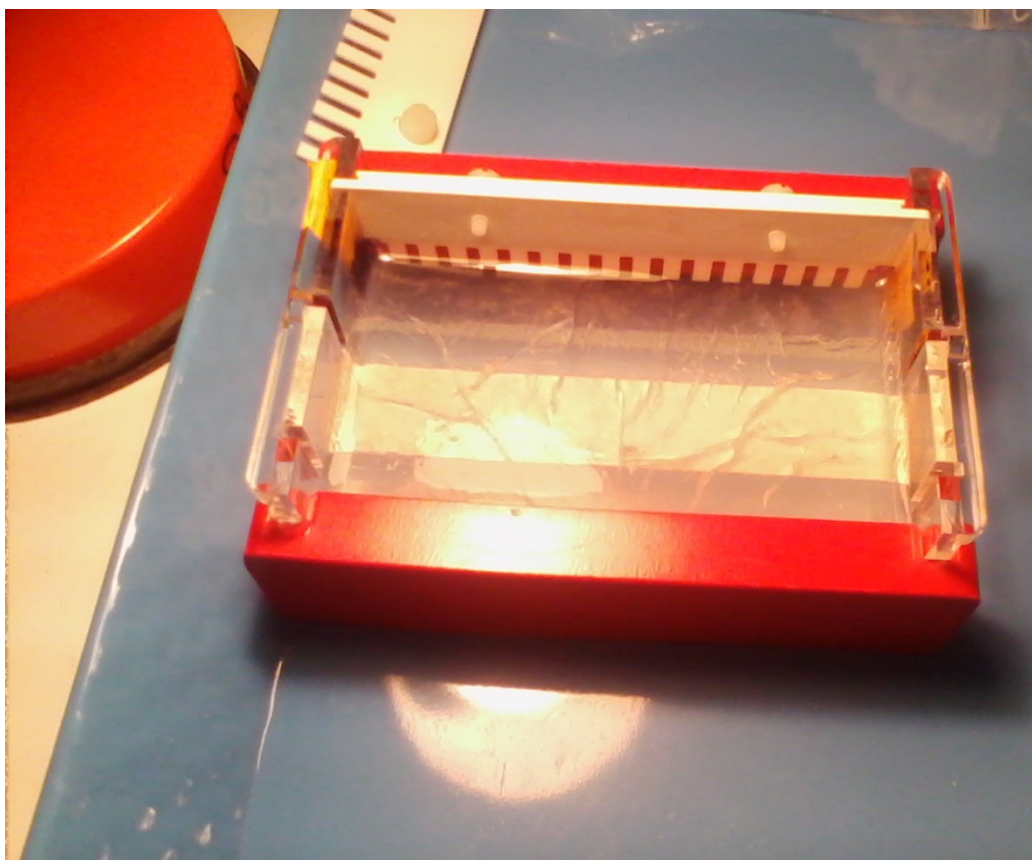
Séparation des cellules mononuclées sur gradient de Ficoll (**Baskara-Yhuellou, 2013**)

ANNEXE 16



Micro-ondes (Modèle SHARP) (Photographie Aké Aya Jeanne A., 2017, IPCI-Cocody)

ANNEXE 17



Plateau de coulée (Photographie Aké Aya Jeanne A., 2017, IPCI-Cocody)

ANNEXE 18



Cuve de migration (modèle MP-300V BIOCOM) (Photographie Aké Aya Jeanne A., 2017, IPCI-Cocody)

ANNEXE 19



Hotte PSM III Advance® (poste de sécurité microbiologique III) (Photographie Aké Aya Jeanne A., 2017, IPCI-Cocody)

ANNEXE 20



Thermocycleur (Applied Biosystems, 2720 ThermalCyber, Singapore) (Photographie Aké Aya Jeanne A., 2017, IPCI-Cocody)

ANNEXE 21

Séquence d'ADN génomique de référence du VDR humain dans le sens 5' vers 3' (NCBI rs NG_008731.1)

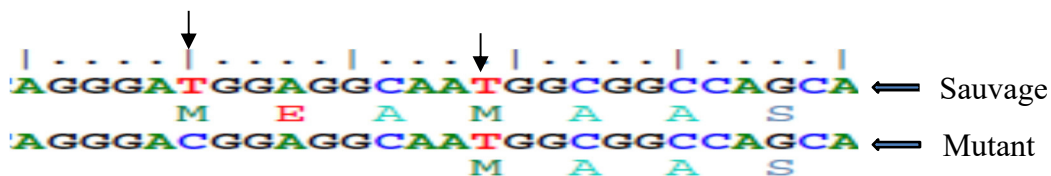
```

1 cctgggctttg aggtatgtgg agcaggtggg aaagcaaatc acaaaaagcc ccgaggagga
61 agaatagtag tgggtacttg ggaatagggc cctggagaca gatggatttg ggtgatgtag
121 cctgtgggtg cctactattc ctgagggcgg ctgactgtgt gattgacacc ttctatgaa
181 attgcaagag actcatttga gctgtctgtt tctgtttatg agagcaaaag atttctgag
241 tgcataagc atctatagcc taagaacagg caaacacatg ggaacatctg tctgagctgt
301 attctatgag ttggttaagc acaacatttg gggatagacc tctgagctag atgatactg
361 tgcactatcc ctgcaactgc acaacttgga gtagatccac caaaaacatc atgatactg
421 ttgaggggtc ttgagggggt actttgaagc cactgatgct ctggcaaatg tctttctgag
481 aatctactgt tcaagatttc aaatgagggc gttactaggt gaggagggat tgtttatgag
541 ttcaagaaag caagttctca tcaactccct ggtatggatc tctgtactca tctgactctc
601 acaataaagc tccgtatgca ccaatgatac ggaagagatt tttttttttt tttttttttt
661 agcaggggtc tccctctgca tccagagcct caactcttgg tggctatctg tggctatctg
721 cagctgagca cctcagagca cctcagagca cctcagagca cctcagagca cctcagagca
781 tcaagagcca caaacacatg cctagatatt ttttaatttt tttgtatgca tgggtttatg
841 ctactgtatg caggctagtc cctagatatt cctcagagca taaactctct actcaacttt
901 cctaagatca tgggtatgca ggcctgagcc actgtatgag gtaggatttt taactatgta
961 tttttgttga caaacattca atggtttgtg aaataaattt ggtgatctcc aaatgagaaa
1021 gtagagagag agagagagag gtagagagag gtagagagag gtagagagag gtagagagag
1081 agagagagag agagagagag gtagagagag gtagagagag gtagagagag gtagagagag
1141 aaagagagag aaagagagag gtagagagag gtagagagag gtagagagag gtagagagag
1201 aatagagagc attgtatgac atttttttga tggagagatt atataatttc ctgagtaaac
1261 taggtatgac taataattca ttttttttga taaattttga taataatttc caataaattc
1321 gttcagagca gcaactttga ttttttttga ttttttttga ttttttttga ttttttttga
1381 ttttttttga ttttttttga ttttttttga ttttttttga ttttttttga ttttttttga
1441 ggtttatgag atataatttc atataatttc atataatttc atataatttc atataatttc
1501 tcaataatttc atataatttc atataatttc atataatttc atataatttc atataatttc
1561 actgatagct atctagatgt ttttttttga ttttttttga agagattttt atctagatct
1621 aactgtatca taactatgaa atatttttga ggggaaaatg gcaattttta agggaaaatc
1681 aaacagatga atagagatga tccagagaga cactttttta cctcagagca cctcagagca
1741 agctttttag cagttcaaaa acctctgttc atcgagagca ggttttttga ggaattttga
1801 gggcaaacat gcaacttttc actctctgca aaactgagag agagtgagag agagtgagag
1861 agctctgagc actctctgca ccaacttttc ccaacttttc ccaacttttc ccaacttttc
1921 gtagagagag gtagagagag gcaacttttc ttttttttga ttttttttga gaaatgaca
2041 ggaatgaaat gaaatgaaat aaacttttgc actgatctct ctggatattt tcaactaaag
2101 tcaagatgag ggggagagag ccttttttga atataatttc atataatttc atataatttc
2161 agagagagag atagagagag ccaacttttc gcaacttttc caacttttca ttttttttga
2221 atacttttga atgataattg gtagagagag gtagagagag gtagagagag gtagagagag
2281 ataaaaagc ataaaaagc ataaaaagc ataaaaagc ataaaaagc ataaaaagc
2341 aaagaaaatt taatgtttc ttgagagct ctgagtaact gttttatgag aggtcaaatg
2401 aggggaaaat aaatattata actatgtatg ctgagatag ttgtttatg aggtcaaatg
2461 agagagagag agctagagca gcaacttttc ttttttttga ttttttttga ttttttttga
2521 taggttttag gtagagagag gtagagagag gtagagagag gtagagagag gtagagagag
2581 ttttttttga ttttttttga aaacttttga aaacttttga aaacttttga aaacttttga
2641 ttttttttga ttttttttga aaacttttga aaacttttga aaacttttga aaacttttga
2701 tagaaaatg atgtagaca aaacttttga aaacttttga aaacttttga aaacttttga
2761 aaagagagag tagagagagag agagagagag gttctgagag gttctgagag gttctgagag
2821 gagagagagc caggtatttg gggaaatgga gtagagagag gttctgagag aggtgagag
2881 gctgtatgag cctgtctgct gggccctgtg tgcactttat atcttttgcac atctgcaaaa
2941 gtagagagag atgagtttgc caacttttga aaacttttga aaacttttga ttttttttga
3001 ttttttttga gtagagagag gtagagagag gtagagagag gtagagagag gtagagagag
3061 ctgagagagag gtagagagag gtagagagag gtagagagag gtagagagag gtagagagag
3121 gtttttttga cttctctatg ctgaaaagc ttgtatgaa atcaactttg atttcttca
3181 gaaattttga atataaaagc agtttaaac ttgtatgaa agtttaaac atttcttca
3241 aggtgtgag caacttttga ctctctatg ctctctatg ctctctatg ctctctatg
3301 atttttttag aggtttttag tgcagatgct cagggcttgc agcaactttc aaagtgtctt
3361 ctgagagagc aaacttttga agggagatct agggagatct agggagatct agggagatct
3421 gttgtttagc atttcttca cctcagagca cctcagagca cctcagagca cctcagagca
3481 gctgttttag gaaagggatc cttctctatt actttctata caggtatgca atctctact
3541 cagactttag gaaactttca agggacattt actctgtttc taagaataaa ttgtctatca
3601 caacttttga tgcactttga ttgactttga aaacttttga aaacttttga aaacttttga
3661 tgcactttga attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag
3721 ttgttttag attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag
3781 ttgttttag attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag
3841 agtttttag attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag
3901 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
3961 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
4021 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
4081 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
4141 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
4201 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
4261 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
4321 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
4381 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
4441 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
4501 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
4561 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
4621 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
4681 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
4741 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
4801 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
4861 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
4921 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
4981 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
5041 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
5101 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
5161 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
5221 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
5281 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
5341 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
5401 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
5461 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
5521 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
5581 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
5641 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
5701 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
5761 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
5821 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
5881 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
5941 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
6001 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
6061 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
6121 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
6181 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
6241 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
6301 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
6361 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
6421 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
6481 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
6541 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
6601 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
6661 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
6721 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
6781 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
6841 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
6901 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
6961 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
7021 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
7081 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag
7141 attttaactc atgtttttag attttttag ttgttttag ttgttttag ttgttttag

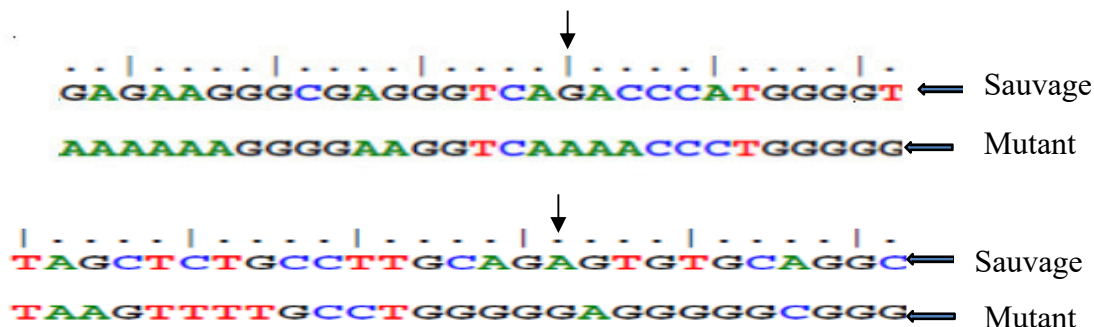
```


ANNEXE 22

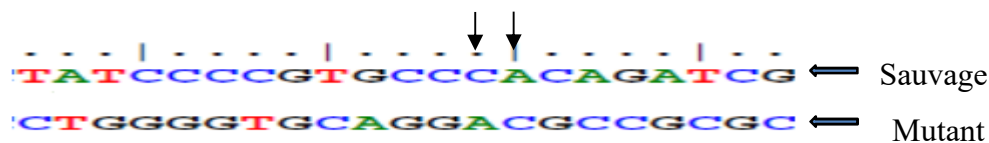
Positions des mutations sur les fragments d'ADN du gène du VDR analysés



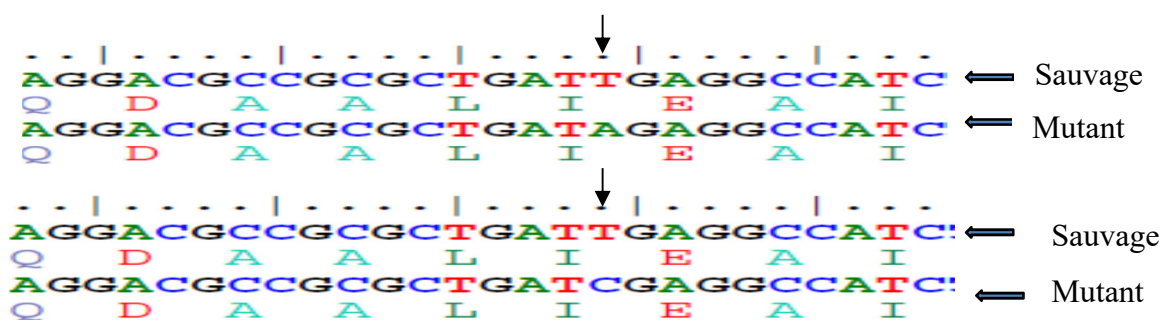
Positions de mutation sur Fok-1 (exon 2) g.30920T>C et g.30929T>C



Positions de mutation sur Bsm-1 (intron 8) g.63510 G>A et g.63905 A>G ou A>C



Positions de mutation sur Apa-1 (intron 8) g.65023 C>A et g.65024 A>C



Position de mutation sur Taq-1 (exon 9) g.65058T>C ou g.65058T>A

NB: Sens des séquences d'ADN 5'→3' ; M= methionine ; I= isoleucine

ANNEXE 23

Les abréviations d'une lettre et de trois lettres pour chaque acide aminé et leur correspondance aux codons ADN

Acide Aminé	Abbréviation 3-Lettres	Abbréviation 1 -Lettre	Codon(s)
Alanine	Ala	A	GCA, GCC, GCG, GCT
Arginine	Arg	R	CGA, CGC, CGG, CGT, AGA, AGG
Aspartic acid	Asp	D	GAC, GAT
Asparagine	Asn	N	AAC, AAT
Cysteine	Cys	C	TGC, TGT
Glutamic acid	Glu	E	GAA, GAG
Glutamine	Gln	Q	CAA, CAG
Glycine	Gly	G	GGA, GGC, GGG, GGT
Histidine	His	H	CAC, CAT
Isoleucine	Ile	I	ATA, ATC, ATT
Leucine	Leu	L	CTA, CTC, CTG, CTT, TTA, TTG
Lysine	Lys	K	AAA, AAG
Methionine	Met	M	ATG
Phenylalanine	Phe	F	TTC, TTT
Proline	Pro	P	CCA, CCC, CCG, CCT
Serine	Ser	S	TCA, TCC, TCG, TCT, AGC, AGT
Threonine	Thr	T	ACT, ACC, ACG, ACT
Tryptophan	Trp	W	TGG
Tyrosine	Tyr	Y	TAC, TAT
Valine	Val	V	GTA, GTC, GTG, GTT
STOP	-	-	TAG, TAA, TGA

ANNEXE 24

Résultats de l'analyse des séquences d'ADN de la population d'étude

Gènes	Exon 2 du VDR				Intron 8 du VDR				Exon 9 du VDR	
	Fok-1 (rs 2228570)		g.30929 T>C		Bsm-1 (rs 1544410)		Apa-1 (rs 7975232)		Taq-1 (rs 731236)	
Position des SNP	g.30920 T>C		g.30929 T>C		g.63510 G>A	g.63905 A>G ou A>C	g.65023 C>A	g.65024 A>C	g.65058 T>A ou T>C	
ID	Codon	AA	Codon	AA	Codon	Codon	Codon	Codon	Codon	AA
IPCIT1	ACG	Thr	ACG	Thr	AAA	GGA	CAC	CAC	ATC	Ile
IPCIT2	ACG	Thr	ATG	Met	CAA	CAG	CAC	CAC	ATA	Ile
IPCIT3	ACG	Thr	ACG	Thr	CAA	GAA	CAC	CAC	ATA	Ile
IPCIT4	ACG	Thr	ATG	Met	CAA	AGA	CAC	CAC	ATA	Ile
IPCIT5	ACG	Thr	ACG	Thr	CAA	AGA	CAC	CAC	ATA	Ile
IPCIT6	ACG	Thr	ATG	Met	CAG	AGA	CAC	CAC	TTA	Leu
IPCIT7	ATG	Met	ATG	Met	CAA	CTG	CAC	CAC	ATA	Ile
IPCIT8	ACG	Thr	ATG	Met	CAA	GAA	CAC	CAC	ATA	Ile
IPCIT9	ACG	Thr	ATG	Met	AAA	CCA	CAC	CAC	ATC	Ile
IPCIT10	ACG	Thr	ATG	Met	CAG	CGG	CAC	CAC	ATA	Ile
IPCIT11	ACG	Thr	ACG	Thr	AAG	GCA	CAC	CAC	ATT	Ile
IPCIT12	ACG	Thr	ATG	Met	CAA	GGA	CAC	CAC	ATT	Ile
IPCIT13	ATG	Met	ATG	Met	CAG	GCG	CAC	CAC	ATT	Ile
IPCIT14	ACG	Thr	ATG	Met	CAG	AGA	CAC	CAC	ATA	Ile
IPCIT15	ATG	Met	ATG	Met	CAG	AGA	CAC	CAC	ATT	Ile
IPCIT16	ATG	Met	ATG	Met	AAG	GCG	CAC	CAC	ATT	Ile
IPCIT17	ACG	Thr	ATG	Met	AAG	GCG	CAC	CAC	ATT	Ile
IPCIT18	ACG	Thr	ATG	Met	CAG	AGA	CAC	CAC	ATA	Ile
IPCIVD1	ACG	Thr	ATG	Met	CAG	AGA	CAC	CAC	ATT	Ile
IPCIVD2	ACG	Thr	ATG	Met	AGG	GGC	CAC	CAC	ATT	Ile
IPCIVD3	ACG	Thr	ATG	Met	CAG	AGA	ACC	ACC	ATT	Ile

IPCIVD4	ACG	Thr	ACG	Thr	CAG	AAG	CAC	CAC	ATT	Ile
IPCIVD5	ACG	Thr	ATG	Met	CAG	AGA	CAC	CAC	ATT	Ile
IPCIVD6	ATG	Met	ATG	Met	TAA	CTG	CAC	CAC	TTA	Leu
IPCIVD7	ACG	Thr	ACG	Thr	CAG	GCA	CAC	CAC	ATT	Ile
IPCIVD8	ACG	Thr	ACG	Thr	CAA	GAG	CAC	CAC	ATT	Ile
IPCIVD9	ATG	Met	ATG	Met	CAG	GGA	CAC	CAC	ATA	Ile
IPCIVD10	ACG	Thr	ACG	Thr	CAA	GGA	CAC	CAC	ATT	Ile
IPCIVD11	ACG	Thr	ACG	Thr	CAG	GGA	CAC	CAC	ATA	Ile
IPCIVD12	ACG	Thr	ATG	Met	CAG	AGA	CAC	CAC	ATT	Ile
IPCIVD13	ACG	Thr	ACG	Thr	CAG	GTA	CAC	CAC	ATT	Ile
IPCIVD14	ACG	Thr	ATG	Met	CAA	GAA	CAC	CAC	ATA	Ile
IPCIVD15	ATG	Met	ATG	Met	CAG	CTG	CAC	CAC	ATA	Ile
IPCIVD16	ACG	Thr	ATG	Met	CAA	GGA	CAC	CAC	ATT	Ile
IPCIVD17	ACG	Thr	ATG	Met	CAG	AGA	CAC	CAC	ATA	Ile
IPCIVD18	ACG	Thr	ATG	Met	CAG	AGA	CAC	CAC	ATT	Ile
IPCIVD19	ACG	Thr	ACG	Thr	CAG	GAA	CAC	CAC	ATT	Ile
IPCIVI1	ACG	Thr	ATG	Met	GCG	GGA	ACC	ACC	TTA	Leu
IPCIVI2	ACG	Thr	ATG	Met	CAG	AGA	ACC	ACC	ATA	Ile
IPCIVI3	ACG	Thr	ATG	Met	GCG	AGA	CAC	CAC	ATT	Ile
IPCIVI4	ACG	Thr	ATG	Met	CAA	GAA	ACC	ACC	ATA	Ile
IPCIVI5	ACG	Thr	ATG	Met	CAG	AGA	ACC	ACC	ATA	Ile
IPCIVI6	ACG	Thr	ATG	Met	AGA	CTG	ACC	ACC	ATT	Ile
IPCIVI7	ACG	Thr	ACG	Thr	AAA	GAG	ACC	ACC	ATA	Ile
IPCIVI8	ACG	Thr	ATG	Met	CAG	GGA	CAC	CAC	ATT	Ile
IPCIVI9	ACG	Thr	ATG	Met	CAG	GGA	CAC	CAC	ATT	Ile
IPCIVI10	ATG	Met	ATG	Met	AAA	AGA	ACC	ACC	ATA	Ile
IPCIVI11	ACG	Thr	ATG	Met	CAG	GGA	CAC	CAC	ATT	Ile
IPCIVI12	ACG	Thr	ATG	Met	CAG	AGA	CAC	CAC	ATT	Ile
IPCIVI13	ACG	Thr	ATG	Met	CAG	GGA	ACC	ACC	ATA	Ile

NB : AA= Acide aminé ; Met= methionine ; Thr= thréonine ; Ile= isoleucine ; Leu= leucine

PUBLICATIONS



Metabolic Disorders of Vitamin D and Parathyroid Hormone in Patients Living with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Taking Antiretroviral Treatment in Côte d'Ivoire

Aya Jeanne Armande Aké^{1,2}, Lydie Boyvin^{1,2*}, Kipré Laurent Séri^{1,2},
Adou Francis Yapo² and Allico Joseph Djaman^{1,2}

¹Department of Clinical and Fundamental Biochemistry, Institut Pasteur of Côte d'Ivoire (IPCI),
01 BP 490, Abidjan 01, Côte d'Ivoire.

²Pharmacodynamics Laboratory of Biochemical, University Félix Houphouët-Boigny (UFHB),
01 BP V34, Abidjan 01, Côte d'Ivoire.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration between all authors. Authors AJAA and KLS wrote the protocol and managed the analyses of the study and wrote the first draft of the manuscript. Authors LB and AFY managed the literature searches and corrected the first draft of the manuscript. Author AJD designed the study. All authors read and approved the final manuscript.

Article Information

DOI: 10.9734/ISRR/2018/43190

Editor(s):

(1) Dr. Gabriella GD D'ettorre, Department of Public Health and Infectious Diseases, University of Rome "Sapienza" and Azienda Policlinico Umberto I, Italy.

Reviewers:

(1) Fred Jonathan Edzeamey, Ashanti Bekwai Municipal Hospital, University of Cape Coast, Ghana.

(2) Mina Ilyas, University of Lahore, Pakistan.

(3) Tabe Franklin Nyenty, University of Ngaoundere, Cameroon.

(4) Iorhen Ephraim Akase, Lagos University Teaching Hospital, Nigeria.

Complete Peer review History: <http://www.sciencedomain.org/review-history/26060>

Original Research Article

Received 26th May 2018
Accepted 8th August 2018
Published 31st August 2018

ABSTRACT

Background: A number of studies have highlighted the phosphocalcic balance disorder and posed the problem of the correlation between 25-hydroxyvitamin D₃ and parathyroid hormone in people living with HIV (PLHIV). However, few studies have been conducted on the link between antiretroviral therapy and the level of 25 (OH) D₃ during HIV infection. The objective of this study was to evaluate 25 (OH) D₃ and the parathyroid status in HIV-infected people taking antiretroviral treatment in Côte d'Ivoire.

*Corresponding author: Email: boyvinlyd@yahoo.fr;

Methods: The study involved 326 adults (163 HIV-infected patient and 163 control subjects). CD4 count was performed in flow cytometry. 25 (OH) D₃ was assayed by HPLC. Parathyroid hormone was assayed using COBAS 6000.

Results: The deficiency of 25 (OH) D₃ was observed in patients aged 18 to 25 years and in patients on AZT-3TC-EFV (13 ± 0.68 ng / mL), AZT-3TC-NVP (11 ± 0.15 ng / mL) and TDF-3TC-EFV (19 ± 0.57 ng / mL). Sufficient levels of 25 (OH) D₃ were observed in patients receiving TDF-3TC-LPV/r. 25 (OH) D₃ deficiency was observed in women receiving AZT-3TC-EFV, AZT-3TC-LPV/r or TDF-3TC-EFV and men receiving AZT-3TC-NVP or AZT-3TC-LPV/r. The levels of PTH were normal in all patients aged 26 to 34 years and treated with AZT-3TC-EFV (9 ± 0.08 pg / mL), AZT-3TC-NVP (7 ± 0.21 pg / mL) or TDF-3TC-EFV (8 ± 0.25 pg / mL). Patients with CD4+ count between 349 and 200 cells / mm³ and patients who were treated with AZT-3TC-NVP (7 ± 0.21 pg / mL) also had normal PTH levels.

Conclusion: Some antiretroviral combinations prescribed in Côte d'Ivoire induce a decrease in the serum level of vitamin D and parathyroid hormone in PLHIV. It would, therefore, be necessary to add a vitamin D supplement when prescribing these combinations, considering its importance in cellular metabolism.

Keywords: 25 (OH) D₃; Côte d'Ivoire; parathyroid hormone; antiretroviral therapy; HIV1.

ABBREVIATIONS

1,25(OH) ₂ D ₃	: 1,25-dihydroxyvitamin D ₃
25(OH)D ₃	: 25-hydroxyvitamin D ₃
BMI	: Body Mass Index
CYP	: Cytochrome P450
PTH	: Parathormone
CYP27B1	: Cytochrome 27 B1
cART	: Combined Antiretroviral Therapy
PLHIV	: Person Living with HIV
VDR	: Vitamin D Receptor
cAMP	: Cyclic Adenosine Monophosphate

1. INTRODUCTION

The human immunodeficiency virus type 1 (HIV 1) has infected 76.1 million people and had caused 35 million deaths worldwide by the end of 2016 [1]. Today, highly active antiretroviral therapy (HAART) has profoundly altered the natural history of HIV infection by dramatically reducing AIDS-related morbidity and mortality [2] and restoring immunological function by suppressing viral load [3]. However, until now, triple antiretroviral therapy cannot eradicate HIV [2,4]. Many studies have reported high early mortality in patients taking antiretroviral therapy in sub-Saharan Africa [5].

During the different stages of HIV infection, increased consumption of vitamin D has been demonstrated. The primary role of 25-hydroxyvitamin D₃ (25 (OH) D₃) is the regulation of calcium and phosphate homeostasis [6,7] in combination with parathyroid hormone (PTH) and calcitonin [8]. 25 (OH) D₃ is used in the differentiation of cells of the immune system that undergo greater renewals during HIV infection

[9]. It is also highly recognised as an immunomodulator. It regulates the pathways involved in killing intracellular pathogens and modulates T cells, cytokines and dendritic cells [10]. Vitamin D deficiency is common among HIV-positive people [11]. This micronutrient has well-known regulatory functions in calcium metabolism, regulation of the pathways involved in killing of intracellular pathogens and modulates T cells, cytokines and dendrite cells [10].

Previous studies have reported a link between antiretroviral therapy and the serum level of 25 (OH) D₃ [3,12]. In Côte d'Ivoire, few studies have been conducted on the link between antiretroviral therapy and the serum level of 25 (OH) D₃ during HIV infection. Boyvin et al. [13] have highlighted the disorder in the phosphocalcic balance and the issue of the correlation between 25-hydroxyvitamin D₃ and parathyroid hormone in people living with HIV (PLHIV).

The objective of this study was to evaluate the issue of 25-hydroxyvitamin D₃ and parathyroid status of the people living with HIV (PLHIV) taking antiretroviral treatment in Côte d'Ivoire.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Study Population

The study was started in November 2016 and continued till December 2017 in the Department of Basic and Medical Biochemistry of the Institute Pasteur of Côte d'Ivoire (IPCI). The study involved 326 adults subjects aged 18 to 49 years. It was a cross-sectional descriptive study of 163 HIV-infected patients (120 were on antiretroviral

therapy versus 43 untreated patients). Treated patients composed of 45 men and 75 women. 163 controls of HIV-negative subjects were included. Pregnant women and children under 15 years were not included in this study.

2.2 Collection of Blood Samples

Blood samples from fasting HIV-positive and HIV-negative subjects were required for the various biochemical and serological tests. Thus, EDTA tubes containing whole blood were used for CD4+ T cells count of PLHIV. A tube without anticoagulant was used for blood collection, and the serum obtained after centrifugation was used for the HIV serological test and the assay of 25-hydroxy vitamin D₃ and parathyroid hormone (PTH).

2.3 HIV Serological Tests

For the detection of anti-HIV antibodies, two rapid tests were used:

- (1) The kit "Alere Determine™ HIV-1/2 kit" which is an immunochromatographic screening test. Its principle is based on the formation of an antigen-antibody complex revealed after staining [14] and
- (2) The rapid "SD Bioline HIV-1/2; 3.0" test which is a confirmatory enzyme immunoassay. This test is based on the detection of anti-HIV1 and anti-HIV2 antibodies directed specifically against their antigens [15].

2.4 Determination of Biological Parameters

The CD4+ lymphocyte count was performed in flow cytometry on the BD FACS Calibur system (BD Becton, Dickinson, USA) from whole blood collected in EDTA. The principle is based on the rapid analysis of moving particles (cells) moving one by one inside a sheath fluid, in front of a laser beam light [16,17].

The assay of the 25-hydroxyvitamin D₃ was performed using UV detection in high-performance liquid chromatography (HPLC) with a Waters® device, after extracting soluble vitamins with hexane protected from light according to the method of Zaman et al. [18].

The parathyroid hormone assay was performed with the COBAS 6000 device (Roche Hitachi,

Japan) following the manufacturer's instructions. The serum reference value of parathyroid hormone was 10 to 65 pg / mL [19,20].

2.5 Statistical Analysis

GraphPad Prism.V5.01 software was used for statistical analysis of the collected data. The data were analysed with one-way ANOVA. The Turkey test was used to compare the variance of HIV-negative subjects with that of PLHIV. The difference between the two variances was significant if $p < 0.05$.

3. RESULTS

3.1 Mean Serum Level of 25 (OH) D₃ and PTH of the Study Population

At the end of this study, blood samples from 326 individuals including 163 HIV-infected patients and 163 HIV-negative people were analysed. Among these 163 HIV-infected patients, 120 were taking antiretroviral therapy and 43 patients were not taking ART.

Significant insufficient serum level ($p < 0.0001$) of 25 (OH) D₃ was observed between ART treated HIV positive patients (120) and ART untreated HIV patients (43) (Table 1).

The average PTH serum level was normal in this study (Table 1).

3.2 Mean Serum Level of 25 (OH) D₃ and PTH in Patients Taking Antiretroviral Therapy

Table 2 indicates a normal serum level of PTH in all the treated patients, according to the gender and type of combined antiretroviral therapy. This population was characterised by an insufficiency of 25 (OH) D₃. However, a deficiency of 25 (OH) D₃ (19 ± 1.55 ng/ml) was observed in 21 (17.5%) patients treated with the combination Zidovudine / Lamivudine / Efavirenz (AZT-3TC-EFV). In addition, sufficient serum levels of 25 (OH) D₃ were observed in patients treated with TDF-3TC-LPV/r (32 ± 1.22 ng / mL) (Table 2).

3.3 Vitamin D and PTH Status of PLHIV According to Gender and Type of Antiretroviral Therapy Taken

In women

According to Fig. 1.a, patients taking TDF-3TC-LPV/r had a normal serum level of vitamin D.

However, vitamin D deficiency was observed in those who were taking AZT-3TC-NVP. On the other hand, vitamin D insufficiency was observed in those who were treated with AZT-3TC-EFV, AZT-3TC-LPV/r or TDF-3TC-EFV combinations (Fig. 1a). PTH serum levels were normal regardless of the combination of antiretroviral taken, as all were higher than 10 pg / mL, despite

of the decrease seen in TDF-3TC-LPV/r treated women (Fig. 1b).

In men

Fig. 2a depicts that patients receiving AZT-3TC-EFV and TDF-3TC-EFV had a deficiency of vitamin D (< 20 ng /mL). However, vitamin D deficiency (< 30 ng / mL) was observed in the

Table 1. Mean value of 25 (OH) D₃ and PTH of the study population

PARAMETERS	Control N = 163	Treated patients N = 120	untreated patients N = 43	p value a	p value b	p value c
25 (OH) D ₃ (30 - 100 ng/mL)	31 ± 1.56	28 ± 2.20	48 ± 2.07	0.3776	< 0.0001*	< 0.0001*
PTH (10 - 65 pg/mL)	27 ± 2.26	25 ± 3.66	23 ± 2.12	0.8821	0.2982	0.5767

a : Control vs Treated Patients; b : Control vs Untreated Patients; c : Treated Patients vs Untreated Patients; * p indicates a statistically significant value. The difference is significant for p < 0.05. Normal reference values of 25 (OH) D₃ : 30 - 100 ng/mL; Deficiency < 20 ng/mL ; Insufficiency 20 - 30 ng/mL ; Sufficiency = 30 ng/mL ; Normal reference values of PTH : 10 - 65 pg/mL.

Table 2. Serum level of 25 (OH) D₃ and PTH of the population taking antiretroviral

PARAMETERS	Number (%)	25 (OH) D ₃ (ng/mL)	PTH (pg/mL)
Gender			
Women	75 (62.5 %)	23 ± 1.21	26 ± 1.81
Men	45 (37.5 %)	23 ± 1.82	29 ± 3.86
Combination of antiretroviral			
AZT-3TC-EFV	21 (17.5 %)	19 ± 1.55	25 ± 0.98
AZT-3TC-NVP	40 (33.3 %)	24 ± 1.68	22 ± 2.31
TDF-3TC-LPV/r	11 (9.2 %)	32 ± 1.22	18 ± 0.27
AZT-3TC-LPV/r	11 (9.2 %)	28 ± 1.18	29 ± 0.60
TDF-3TC-EFV	37 (30.8 %)	22 ± 1.81	29 ± 4.19

AZT : Zidovudine or 3'-azido-3'-dideoxythymidin; 3TC : Lamivudine; EFV : Efavirenz ; TDF : Tenofovir disoproxil fumarate; LPV/r : Lopinavir/ritonavir ; Normal reference values of 25 (OH) D₃ : 30 - 100 ng/mL; Deficiency < 20 ng/mL ; Insufficiency 20 - 30 ng/mL ; Sufficiency = 30 ng/mL ; Normal reference values of PTH : 10 - 65 pg / mL

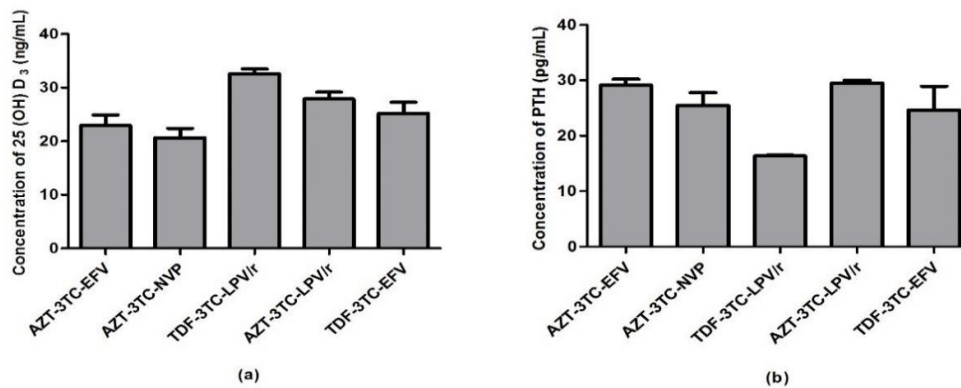


Fig. 1. Serum level of 25 (OH) D₃ (a) and PTH (b) of HIV-infected women taking antiretroviral therapy

patients taking AZT-3TC-NVP and AZT-3TC-LPV/r. In contrast, those treated with the combination TDF-3TC-LPV/r were characterised by vitamin D sufficiency (Fig. 2a). PTH levels were normal regardless of the combination of antiretroviral taken, although a decrease was observed in those treated with AZT-3TC-EFV, AZT-3TC-NVP and TDF-3TC-LPV/r (Fig. 2b).

3.4 Vitamin D₃ and PTH Serum Level in Patients Treated According to Age, CD4 + T Cell Count and Antiretroviral Therapy

A deficiency of 25 (OH) D₃ was observed in patients treated with the combination of AZT-3TC-NVP (11 ± 0.15 ng / mL) aged 18 to 25 years and with a CD4 + T cell count below 200 cells / mm³ (15 ± 0.17 ng / mL) (Table

3). Similarly, a 25 (OH) D₃ deficiency was observed in the patients treated with the combination of AZT-3TC-EFV (13 ± 0.68 ng / mL) and having a CD4 + T cell count below 200 cell / mm³ on one hand, and those in the 499-350 cell / mm³ range treated with the combination TDF-3TC-EFV (19 ± 0.57 ng / mL) on the other hand. However, in all subjects treated with the combination of TDF- 3TC-LPV/r, a sufficient serum level of 25 (OH) D₃ was observed regardless of the age and the level of CD4+ T cell count (Table 3).

Normal serum levels of PTH were observed regardless of age, CD4+ T cell count, and the type of antiretroviral therapy taken. However, PTH deficiency was observed in subjects aged 26 to 34 years treated with the combination AZT-

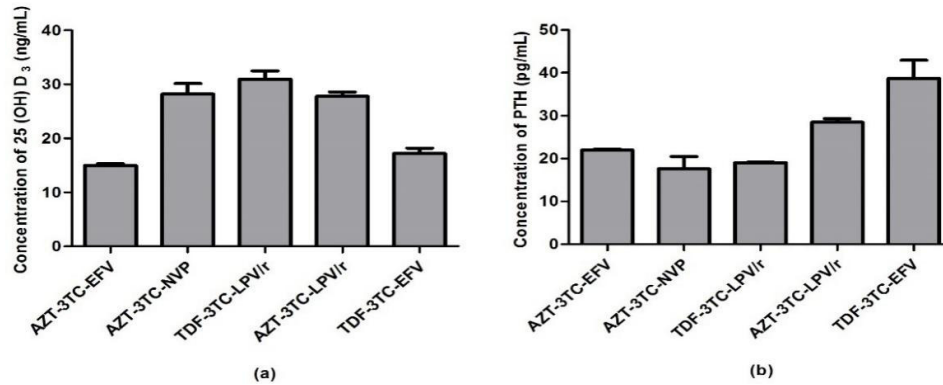


Fig. 2. Serum level of 25 (OH) D₃ (a) and PTH (b) of HIV-infected men taking antiretroviral therapy

Table 3. Average serum level of 25 (OH) D₃ and PTH according to age, CD4+ T count and antiretroviral therapy

PARAMETERS	AZT-3TC-EFV N = 21		AZT-3TC-NVP N = 40		TDF-3TC-LPV/r N = 11		AZT-3TC-LPV/r N = 11		TDF-3TC-EFV N = 37	
	25 (OH) D ₃ (ng/mL)	PTH (pg/mL)	25 (OH) D ₃ (ng/mL)	PTH (pg/mL)	25 (OH) D ₃ (ng/mL)	PTH (pg/mL)	25 (OH) D ₃ (ng/mL)	PTH (pg/mL)	25 (OH) D ₃ (ng/mL)	PTH (pg/mL)
Age (years)										
18 - 25	0	0	11 ± 0.15	12 ± 0.13	0	0	33 ± 0.22	30 ± 0.09	22 ± 0.15	22 ± 0.12
26 - 34	23 ± 0.14	9 ± 0.08	28 ± 1.84	7 ± 0.21	41 ± 0.16	18 ± 0.16	0	0	27 ± 1.14	8 ± 0.25
35 - 49	26 ± 1.12	31 ± 0.86	29 ± 1.78	31 ± 3.19	33 ± 0.65	17 ± 0.27	30 ± 0.72	28 ± 0.77	27 ± 1.85	32 ± 4.16
Lymphocytes T CD4 count (cell/mm³)										
> 500	35 ± 1.24	32 ± 0.47	30 ± 1.69	31 ± 3.76	33 ± 0.68	17 ± 0.42	28 ± 1.25	31 ± 0.15	22 ± 0.85	17 ± 2.12
499 - 350	25 ± 1.14	26 ± 1.72	21 ± 0.47	20 ± 1.03	32 ± 0.84	18 ± 0.17	22 ± 0.21	22 ± 0.21	19 ± 0.57	17 ± 4.17
349 - 200	23 ± 0.94	27 ± 0.94	34 ± 2.42	7 ± 0.21	35 ± 0.84	17 ± 0.17	31 ± 0.08	27 ± 0.61	28 ± 2.12	40 ± 3.89
< 200	13 ± 0.68	28 ± 0.25	15 ± 0.17	29 ± 0.59	37 ± 0.17	18 ± 0.21	0	0	20 ± 3.12	43 ± 3.39

3TC-EFV (9 ± 0.08 pg / ml), AZT-3TC-NVP (7 ± 0.21 pg / ml) or with TDF-3TC-EFV (8 ± 0.25 pg / ml). The same is true for those treated with the combination of AZT-3TC-NVP with CD4 + T cell count between 349 and 200 cells / mm³ (7 ± 0.21 pg / ml) (Table 3).

4. DISCUSSION

In this study, a lower level of 25 (OH) D₃ was observed in patients taking ARV therapy compared to the patients not taking an ARV. These results are in agreement with those of Gichuhi et al. [21] who also reported lower 25 (OH) D₃ level in PLHIV taking ARV. Generally, vitamin D deficiency in HIV-infected individuals is linked to factors such as non-Caucasian race, high body mass index, hypertension, lack of physical exercise, decreased exposure to UV rays, decreased glomerular filtration [22], and poor absorption [12]. Similarly, several factors such as female gender, age, sun exposure, black pigmentation of the skin, non-Caucasian race, body mass index (BMI), gastrointestinal absorption disorders. Kidney disease, risk factors for cardiovascular disease (diabetes), co-infections such as HIV / TB (TB), HIV / hepatitis C (VHC) and daily alcohol consumption are cited as the natural risk factors for hypovitaminosis D in seropositive and seronegative cohorts [2]. In addition, previous studies have suggested that VDR gene polymorphism may be important for susceptibility to inflammatory diseases. Indeed, VDR gene polymorphism can negatively affect the 25 (OH) D₃ status [23]. According to Lake and Adams [24], antiretroviral therapy may also disrupt the metabolism of vitamin D. According to the National Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES) database, the prevalence of vitamin D deficiency according to age, race and sex was high in HIV-infected individuals (70%) but lower than US adults (79%) [22]. The circulation of vitamin D₃ deficiency could also be explained due to the variations in the locus encoding VDR during HIV infection [25]. The dysfunction of VDR related to 25-hydroxyvitamin D₃ deficiency [26] is associated with the progression of HIV infection [25].

In this present study, a normal serum level of 25 (OH) D₃ was observed in some patients treated with TDF-3TC-LPV/r. However, certain patients treated with the combination AZT-3TC-EFV, AZT-3TC-NVP, AZT-3TC-LPV/r or TDF-3TC-EFV were characterised by a lower serum level of 25 (OH) D₃. Both protease inhibitors (PIs) and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors

(NNRTIs) have been associated with the disruption of vitamin D metabolic pathways [27,28]. In general, NNRTIs, react with vitamin D through cytochromes (CYP3A4) required for vitamin D metabolism [11]. Thus, intake of efavirenz (EFV) has been associated with 25 (OH) D₃ deficiency [10,12]. Efavirenz lowers the level of 25 (OH) D₃ [3] by inducing the catabolism of 25 (OH) D₃ by the induction of cytochrome CYP24A, the enzyme that converts 25 (OH) D₃ to its inactive metabolite, namely 24,25-dihydroxyvitamin D₃ [2]. Contrary to NNRTIs, Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTIs) are not metabolised by cytochromes [11]. Studies have shown that zidovudine is also associated with vitamin D deficiency [29]. This lower value of 25 (OH) D₃ is observed in some women treated with the combination AZT-3TC-EFV, AZT-3TC-NVP, AZT-3TC-LPV/r or TDF-3TC-EFV. Within the class of NNRTIs, a link with low vitamin D status has been reported in the case of efavirenz but not for nevirapine [30-32]. Some men who received the combination AZT-3TC-EFV, AZT-3TC-NVP, AZT-3TC-LPV/r or TDF-3TC EFV treatment were characterised by a lower vitamin D level. Generally, women are more exposed to vitamin D deficiency than men [33]. Adipose tissue is able to store vitamin D [34]; this could explain the lower serum level of 25 (OH) D₃ in women. However, it has long been shown that HIV infection induces the expression and secretion of IL-6 by monocytes and macrophages. Indeed, adipose tissue can produce, in some cases, up to 25% of circulating IL-6, proinflammatory cytokine [35]. According to Yilma et al. [36], patients who were treated with a combination of TDF-3TC-EFV and AZT-3TC-NVP had a lower 25 (OH) D₃ serum level after three months of treatment compared to TDF-3TC-NVP. In addition, all 11 patients treated with TDF-3TC-LPV/r, regardless of gender, age and CD4+ T cell count, had normal serum levels of 25 (OH) D₃ and PTH. These results are in agreement with that of Klassen et al. [37], who found normal serum levels of 25 (OH) D₃ and PTH in patients receiving TDF. In addition, intake of tenofovir or ritonavir has been shown to be associated with high serum levels of 25 (OH) D₃ [22]. Ritonavir appears to interfere with vitamin D metabolism by inhibiting 1 α - and 25 α -hydroxylation in both hepatocytes and monocytes in culture. Therefore, reducing the conversion of 25 (OH) D₃ to its active metabolite, this could potentially explain the increase of 25 (OH) D₃ in subjects with low concentrations of 1,25 (OH)₂ D₃ [38]. As for tenofovir, no known effect on vitamin D metabolism has been

reported. However, the combination of protease inhibitors (PIs) and tenofovir results in more deregulation of mineral metabolism than an alteration in the level of 25 (OH) D₃ [22]. In addition, tenofovir is known to induce renal proximal tubule dysfunction which may reduce the effect of 1 α -hydroxylase in the kidney, which metabolises vitamin D to 1,25-hydroxyvitamin D in its active form, thus leading to accumulation of vitamin D [39]. This situation is associated with phosphaturia/hypophosphatemia, and 1,25 (OH)₂ D₃ is a hormone that counteracts hypophosphatemia. Therefore, it is possible that inhibition in the production of 1,25 (OH)₂ D₃ by protease inhibitors could exacerbate the deregulation of mineral metabolism in patients receiving tenofovir [22]. In this study, normal serum levels of PTH were found regardless of age, CD4+ T cell count and type of antiretroviral therapy. In some patients treated with the combination TDF-3TC-LPV/r, the PTH produced could not promote the conversion of 25 (OH) D₃ into 1,25 (OH)₂ D₃ (active form). However, the deficiency of PTH (hypoparathyroidism) was observed in patients aged 26-34 years treated with the combination AZT-3TC-EFV, AZT-3TC-NVP or TDF-3TC-EFV. It is the same for those who were treated with the combination AZT-3TC-NVP having CD4+ T cell count between 349 and 200 cell / mm³. It should be noted that a decrease in the serum level of PTH has already been reported in HIV-infected patients [40]. The mechanism could be related to antibodies against parathyroid cells. Using anti-Leu3a, a monoclonal antibody recognising CD4, it was found that HIV-positive patients had a CD4 molecule on the surface of parathyroid cells, indicating the possibility of functional inhibition by anti-CD4 antibodies or direct HIV infection [41]. In addition, TNF- α appears to interfere with the stimulatory effect of PTH by mechanisms involving negative regulation of PTH receptors, alteration of protein kinase C activity, and inhibition of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response after PTH stimulation [42].

Furthermore, a lower serum concentration of 25 (OH) D₃ was reported in patients treated with the combination AZT-3TC-NVP aged 18 to 25 years and in those with a CD4+ T lymphocyte count below 200 cells / mm³. This age group particularly is at risk. Indeed, in South Africa, 25 (OH) D₃ deficiency has been reported in patients aged 15 to 29 years. This situation has been observed in women aged 15 to 24 and in men aged 20 to 29 [43]. A deficiency in 25 (OH) D₃ was also observed in patients who were treated

with the combination AZT-3TC-EFV and having a CD4+ T lymphocyte count of less than 200 cell / mm³ on one hand, and those having CD4+ T lymphocyte count in the range 499-350 cell / mm³ treated with the combination TDF-3TC-EFV on the other hand. Indeed, increased utilisation of vitamin D during HIV infection has been demonstrated. Vitamin D is used in the differentiation of immune system cells that undergo greater renewal during HIV infection [9]. It regulates the pathways involved in the destruction of intracellular pathogens and modulates T cells, cytokines and dendritic cells [10]. Its deficiency or insufficiency would hasten the destruction of CD4 and the progression of the disease [30]. Complicated infections resulting from poor immunity (below 200 cell / mm³) require hospitalisation, which significantly reduces patients' exposure to the sun. Also, this vitamin D deficiency observed in this study could be due to complicated infections and hospitalization, which could be responsible for malnutrition and reduced consumption of vitamin D-containing foods [2].

5. CONCLUSION

This study suggests that HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy are at high risk of reduced serum level of vitamin D. However, some HIV patients treated with the combination TDF-3TC-LPV/r recorded normal serum levels of 25 (OH) D₃. In addition, PTH deficiency (hypoparathyroidism) was observed in some individuals aged 26 to 34 years treated with the combination AZT-3TC-EFV, AZT-3TC-NVP or TDF-3TC-EFV, and those who were on AZT-3TC-NVP with CD4+ T cell counts between 349 and 200 cell/mm³. Therefore, vitamin D and PTH status should be checked regularly in all HIV-infected patients, taking into consideration the clinical stage.

CONSENT AND ETHICAL APPROVAL

The study was conducted in accordance with the Helsinki 2000 Declaration on HIV and AIDS Research in Poor Countries and in accordance with the local legislation on the National Program for the Care of People Living with HIV / AIDS (Decree No. 411 of 23 December 2001). The blood samples were collected from HIV-positive patients for whom Pastor Institute of Côte d'Ivoire (IPCI) is a reference Laboratory and support centre for public health programs in Côte d'Ivoire in agreement with the Global Fund for AIDS, Tuberculosis and Malaria. In addition, for

research purposes, informed consents were obtained from individuals for the use of their blood samples taken in the course of biological monitoring.

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

1. Programme Commun des Nations Unies sur le VIH et le sida. Fiche D'information 2016. UNAIDS. 2016;1–9.
2. Mansueto P, Seidita A, Vitale G, Gangemi S, Iaria C, Cascio A. Vitamin D deficiency in HIV infection: Not only a bone disorder. *Biomed Res Int.*; 2015. (Article ID 735615)
Available:<http://dx.doi:10.1155/2015/735615>
3. Biadgilign S, Reda AA, Digaffe T. Predictors of mortality among HIV infected patients taking antiretroviral treatment in Ethiopia: A retrospective cohort study. *AIDS Res Ther.* 2012;9:1–7.
4. Nolan DJ, Rose R, Rodriguez PH, Salemi M, Singer EJ, Lamers SL, et al. The spleen is an HIV-1 sanctuary during combined antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2018;34(1):123–125.
5. Lawn SD, Harries AD, Anglaret X, Myer L, Wood R. Early mortality among adults accessing antiretroviral treatment programmes in sub-Saharan Africa. *AIDS.* 2008;22(15):1897–1908.
6. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007;357(3):266–281.
7. Schuch NJ, Garcia VC, Vivolo SR, Martini LA. Relationship between Vitamin D Receptor gene polymorphisms and the components of metabolic syndrome. *Nutr J.* 2013;12:96.
DOI: 10.1186/1475-2891-12-96
8. Akesson K. Bone and joint diseases around the world. Sweden: A brief update on burden and priority. *J Rheumatol Suppl.* 2003;67:38–40.
9. Holick MF, MF H. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(Suppl 6):1678S–1688S.
10. Havers FP, Detrick B, Cardoso SW, Berendes S, Lama JR, Sugandhavesa P, et al. Change in vitamin D levels occurs early after antiretroviral therapy initiation and depends on treatment regimen in resource-limited settings. *PLoS One.* 2014; 9(4).
DOI: 10.1371/journal.pone.0095164
11. Conesa-Botella A, Florence E, Lynen L, Colebunders R, Menten J, Moreno-Reyes R. Decrease of vitamin D concentration in patients with HIV infection on a non nucleoside reverse transcriptase inhibitor-containing regimen. *AIDS Res Ther.* 2010; 7(1):40.
DOI: 1742-6405-7-40 [pii]r10.1186/1742-6405-7-40
12. Allavena C, Delpierre C, Cuzin L, Rey D, Viget N, Bernard J, et al. High frequency of vitamin D deficiency in HIV-infected patients: Effects of HIV-related factors and antiretroviral drugs. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(9):2222–2230.
13. Boyvin L, Aké JA, Séri KL, M'Boh GM, Yapo AF, Djaman JA. 25 (OH) vitamin D level and calcium/phosphorus metabolism disorders in patients living with HIV in Abidjan. *Int J Biochem Res Rev.* 2017; 17(4):1–7.
14. Crucitti T, Taylor D, Beelaert G, Fransen K, Van Damme L. Performance of a rapid and simple HIV testing algorithm in a multicenter phase III microbicide clinical trial. *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18(9): 1480–1485.
15. Sagar NA, Sen M, Yadav VK. Serodiagnosis of HIV by rapid test and ELISA test assay in a tertiary care centre in Northern India. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 2015;4(10):623–629.
16. Ormerod MG, Imrie PR. Flow cytometry. *Human Pres. USA.* 1990;558.
17. Nicholson JKA, Hubbard M, Jones BM. Use of CD45 fluorescence and side-scatter characteristics for gating lymphocytes when using the whole blood lysis procedure and flow cytometry. *Commun Clin Cytom.* 1996;26(1):16–21.
18. Zaman Z, Fielden P, Frost PG. Simultaneous determination of vitamins A and E and carotenoids in plasma by reversed-phase HPLC in elderly and younger subjects. *Clin Chem.* 1993;39(11): 2229–2234.
19. Havens PL, Stephensen CB, Hazra R, Flynn PM, Wilson CM, Rutledge B, et al. Vitamin D3 decreases parathyroid hormone in HIV-infected youth being

- treated with tenofovir: A randomized, placebo-controlled trial. *Clin Infect Dis*. 2012;54(7):1013–1025.
20. Souberbielle JC, Brazier F, Piketty ML, Cormier C, Minisola S, Cavalier E. How the reference values for serum parathyroid hormone concentration are (or should be) established? *J Endocrinol Invest*. 2017; 40(3):241–256.
 21. Gichuhi CW, Kariuki D, Nyerere A, Riyat M, Gichuhi CW. Studies on vitamin D levels in serum of HIV infected patients: Their effect on progression towards AIDS. *World J AIDS*. 2013;4(4):422–429.
 22. Yin M, Stein E. The effect of antiretrovirals on vitamin D. *Clinical Infectious Diseases*. 2011;52(3):406–408.
 23. Yin K, Agrawal DK. Vitamin D and inflammatory diseases. *J Inflamm Res*. 2014;7:69–87.
 24. Lake JE, Adams JS. Vitamin D in HIV-infected patients. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2011;8(3):133–141.
 25. Nieto G, Barber Y, Rubio MC, Rubio M, Fibla J. Association between AIDS disease progression rates and the Fok-I polymorphism of the VDR gene in a cohort of HIV-1 seropositive patients. In: *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2004;199–207. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2004.03.086
 26. Waterhouse JC, Perez TH, Albert PJ. Reversing bacteria-induced vitamin D receptor dysfunction is key to autoimmune disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1173: 757–765.
 27. Theodorou M, Serste T, Van Gossum M, Dewit S. Factors associated with vitamin D deficiency in a population of 2044 HIV-infected patients. *Clin Nutr*. 2014;33(2): 274–279.
 28. Wohl DA, Orkin C, Doroana M, Pilotto JH, Sungkanuparph S, Yeni P, et al. Change in vitamin D levels and risk of severe vitamin D deficiency over 48 weeks among HIV-1-infected, treatment-naive adults receiving rilpivirine or efavirenz in a Phase III trial (ECHO). *Antivir Ther*. 2014;19(2):191–200.
 29. Fox J, Peters B, Prakash M, Arribas J, Hill A, Moecklinghoff C. Improvement in vitamin D deficiency following antiretroviral regime change: Results from the MONET trial. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011; 27(1):29–34.
 30. Welz T, Childs K, Ibrahim F, Poulton M, Taylor CB, Moniz CF, et al. Efavirenz is associated with severe vitamin D deficiency and increased alkaline phosphatase. *AIDS*. 2010;24(12):1923–1928.
 31. Dao CN, Patel P, Overton ET, Rhame F, Pals SL, Johnson C, et al. Low vitamin D among HIV-infected adults: Prevalence of and risk factors for low vitamin D levels in a cohort of HIV-infected adults and comparison to prevalence among adults in the US general population. *Clin Infect Dis*. 2011;52(3):396–405.
 32. Fux CA, Baumann S, Furrer H, Mueller NJ. Is lower serum 25-hydroxy vitamin D associated with efavirenz or the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor class? *AIDS*. 2011;25(6):876–878.
 33. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*. 2004; 80(Suppl 6):1678S–1688S.
 34. Abbas MA. Physiological functions of vitamin D in adipose tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2017;165:369–381.
 35. Borges ÁH, O'Connor JL, Phillips AN, Rönsholt FF, Pett S, Vjecha MJ, et al. Factors associated with plasma IL-6 levels during HIV infection. *J Infect Dis*. 2015; 212(4):585–595.
 36. Yilma D, Kæstel P, Olsen MF, Abdissa A, Tesfaye M, Girma T, et al. Change in serum 25-hydroxyvitamin D with antiretroviral treatment initiation and nutritional intervention in HIV-positive adults. *Br J Nutr*; 2016. DOI: 10.1017/S0007114516003743
 37. Klassen K, Martineau AR, Wilkinson RJ, Cooke G, Courtney AP, Hickson M. The effect of tenofovir on vitamin D metabolism in HIV-infected adults is dependent on sex and ethnicity. *PLoS One*. 2012;7(9). DOI: 10.1371/journal.pone.0044845
 38. Hamzah L, Tiraboschi JM, Iveson H, Toby M, Mant C, Cason J, et al. Effects on vitamin D, bone and the kidney of switching from fixed-dose tenofovir disoproxil fumarate/emtricitabine/efavirenz to darunavir/ritonavir monotherapy: A randomized, controlled trial (MIDAS). *Antivir Ther*. 2016;21(4):287–296.
 39. Rosenvinge MM, Gedela K, Copas AJ, Wilkinson A, Sheehy CA, Bano G, et al. Tenofovir-linked hyperparathyroidism is independently associated with the presence of vitamin D deficiency. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010;54(5). DOI: 10.1097/QAI.0b013e3181cae3baa

40. Cherqaoui R, Shakir KM, Shokrani B, Madduri S, Farhat F, Mody V. Histopathological changes of the thyroid and parathyroid glands in HIV-infected patients. *J Thyroid Res.* 2014;364146. DOI: 10.1155/2014/364146
41. Hellman P, Karlsson-Parra A, Klareskog L, Ridefelt P, Bjerneroth G, Rastad J, et al. Expression and function of a CD4-like molecule in parathyroid tissue. *Surgery.* 1996;120(6):985–992.
42. Haug CJ, Aukrust P, Haug E, Mørkrid L, Müller F, Frøland SS. Severe deficiency of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in human immunodeficiency virus infection: Association with immunological hyperactivity and only minor changes in calcium homeostasis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:3832–3838.
43. Abdool Karim Q, Abdool Karim SS, Singh B, Short R, Ngxongo S. Seroprevalence of HIV infection in rural South Africa. *AIDS.* 1992;6:1535–1539. DOI: 10.1097/00002030-199212000-00018

© 2018 Aké et al.; This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Peer-review history:

*The peer review history for this paper can be accessed here:
<http://www.sciencedomain.org/review-history/26060>*



Vitamin D Deficiency and Evaluation of the Parathyroid Hormone Status in People Living with HIV in Côte d'Ivoire

Aya Jeanne Armande Aké^{1,2}, Lydie Boyvin^{1,2*}, Kipré Laurent Séri^{1,2},
Mouso Jean Maurel Allico^{1,2}, Kadjoweli Djakaridja Yéo^{1,2},
Adou Francis Yapo² and Allico Joseph Djaman^{1,2}

¹Department of Clinical and Fundamental Biochemistry, Institut Pasteur of Côte d'Ivoire (IPCI),
01 BP 490, Abidjan 01, Côte d'Ivoire.

²Pharmacodynamics Laboratory of Biochemical, University Félix Houphouët-Boigny (UFHB),
01 BP V34, Abidjan 01, Côte d'Ivoire.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration between all authors. Authors AJAA and LB wrote the protocol and the first draft of the manuscript. Authors KLS, MJMA and KDY supervised blood samples collection and managed the analyses of the study. Author AFY corrected the first draft of the manuscript. Author AJD designed the study, managed the literature searches and the final correction of the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Article Information

DOI: 10.9734/AJRB/2018/41385

Editor(s):

(1) Mohamed Fawzy Ramadan Hassanien, Professor, Biochemistry Department, Faculty of Agriculture, Zagazig University, Zagazig, Egypt.

Reviewers:

(1) Naoki Hashimoto, School of Medicine, Kindai University, Japan.

(2) Ayfer Gozu Pirinccioglu, Dicle University Faculty of Medicine, Turkey.

Complete Peer review History: <http://www.sciencedomain.org/review-history/24370>

Original Research Article

Received 15th February 2018

Accepted 24th April 2018

Published 28th April 2018

ABSTRACT

Background: Micronutrients play an important role in the human immune system. During HIV infection, the virus utilises the micronutrients of the body, for its replication causing metabolic disorders including phosphocalcic. Parathyroid hormone (PTH), vitamin D₃ (25-hydroxyvitamin D₃) and calcitonin are essential for the maintenance of phosphocalcic homeostasis and the proper functioning of the body. In Côte d'Ivoire, very few studies on HIV infection and the mechanism of phosphocalcic metabolism have been done. The purpose of this study was to determine the status of 25 (OH) D₃ and parathyroid hormone in people living with HIV.

*Corresponding author: E-mail: boyvinlyd@yahoo.fr;

Methodology: The study involved 326 adults (163 HIV-positive and 163 HIV-negative as control subjects). After confirmation by HIV serologic scanning result, CD4 count was performed by flow cytometry (Facs Calibur). Assays for 25 (OH) D₃ and PTH were performed by HPLC and COBAS 6000 automated systems, respectively.

Results: A decrease in mean values of 25 (OH) D₃ (16 ± 0.46 ng / mL) was observed in 50% of HIV-infected on ART and 87% of these patients presented a normal PTH level (28 ± 1.95 pg / mL). Deficiency of 25 (OH) D₃ (20 ± 1.03 ng / mL) is higher in HIV-infected on ART who have a CD4 count < 200 cells / mL.

Conclusion: Parathyroid hormone levels were normal in this study. Insufficiency or deficiency of 25-hydroxyvitamin D₃ is more common in HIV-infected on ART with a CD4 count < 200 cells / mL. This decrease characterized the degree of immunodepression.

Keywords: 25-hydroxyvitamin D₃; ART; Côte d'Ivoire; HIV; parathyroid hormone.

ABBREVIATIONS

PTH : Parathyroid hormone
CYP27B1 : Cytochrome 27 B1
cART : Combined antiretroviral therapy
EDTA : Ethylene diamine tetra acetic
PLHIV : People living with HIV
FGF-23 : Fibroblast Growth Factor 23
VDR : Vitamin D Receptor
cAMP : Cyclic Adenosine monophosphate

1. INTRODUCTION

Human immunodeficiency virus (HIV) infection is pandemic affecting 33.3 million people worldwide. In 2015, 1.1 million deaths and 2.1 million new HIV infections were recorded [1]. Sub-Saharan Africa remains severely affected by this pandemic and accounted for about 70% of new HIV infections [2]. In Côte d'Ivoire, the prevalence rate reduced from 3.4% in 2012 to 2.7% in 2016 [3].

During HIV infection, the virus uses nutrients, including micronutrients of the body, for replication [4]. This causes disorders of mineral metabolism, including phosphocalcic [5,6]. The regulation of calcium and phosphorus homeostasis involves parathyroid hormone (PTH), vitamin D₃ (25-hydroxyvitamin D₃) and calcitonin [7]. PTH is secreted in the parathyroid glands. It is a hypercalcemic hormone. In case of hypocalcaemia, parathyroid hormone facilitates mobilization of bone calcium, stimulates the activation of vitamin D₃ in the kidneys, which in turn increases, the intestinal absorption of calcium, while inhibiting its excretion in the urine [8]. Vitamin D₃ is a circulating steroid hormone that exists in the human body in two forms: 25 (OH) D₃, a form of reserve that under the action of 1- α -hydroxylase or CYP27B1 renal,

hydroxylated to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25 (OH)₂D₃), its active form [9]. Its main role is the regulation of calcium and phosphate homeostasis [10]. It also controls cell proliferation and differentiation [11].

Concerning HIV treatment, combined antiretroviral therapy (cART) does not eradicate HIV, which persists for years and can re-establish replication if treatment is stopped [12]. cART expose HIV-infected patients to chronic adverse effects, including neurocognitive disorders, cardiovascular and metabolic diseases, kidney and bone diseases (osteopenia / osteoporosis) and cancer [13].

In Côte d'Ivoire, few studies about the mechanism of regulation of phosphocalcic homeostasis in HIV-positive Ivorian patients have been undertaken [6]. The main objective of this study was therefore to determine the 25-hydroxyvitamin D₃ and parathyroid status of HIV-positive patients.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Type of Study

This is a cross-sectional descriptive study conducted from November 2015 to December 2016 at the Department of Fundamental Biochemistry and Medical at Institut Pasteur of Côte d'Ivoire (IPCI).

2.2 Biological and Technical Material

A collection of fasting venous blood samples from 326 adult subjects (163 HIV-positive patients and 163 HIV-negative controls) was obtained for the various biochemical and serological tests. HIV-positive pregnant women

were not included in this study. Thus, a blood tube containing EDTA (Thermo, Tokyo, Japan) was used for the determination of CD4 + T cell count (whole blood) of HIV-positive subjects. A blood tube without anticoagulant (dry tubes) was used for HIV serological tests and biochemical parameters. Finally, the blood glucose assay was performed in serum from tube containing potassium oxalate and sodium fluoride.

Two rapid serological tests were performed for the detection of anti-HIV antibodies: the Alere Determine™ HIV-1/2 immunochromatographic kit whose principle is based on the formation of an antigen-antibody complex revealed after staining [14] and the SD Bioline HIV-1/2 3.0 immunoenzymatic confirmation test based on the detection of anti-HIV1 and anti-HIV2 antibodies specifically directed against antigens [15].

2.3 Biochemical Parameters

The CD4 + T lymphocyte count was performed in flow cytometry on the FACS Calibur from whole blood collected in EDTA [16]. The assay of 25-hydroxyvitamin D₃ is carried out using UV detection in high performance liquid chromatography (HPLC) with a Waters® device, after extraction of soluble vitamins with hexane in the dark protected from the light according to the method described by Zaman et al. [17]. The parathyroid hormone assay, based on electrochemiluminescence detection, was performed on COBAS 6000 [18]. Assay of biochemical parameters such as Creatinine, Urea, Blood glucose, Alanine aminotransferase, Calcium, Phosphorus, Magnesium and Alkaline phosphatase was performed on COBAS C311 HITACHI. The principle is based on enzymatic and colorimetric methods that use a chromogen. The intensity of the observed coloration is directly proportional to the concentration of the substance assayed [19].

2.4 Statistical Analyses

The statistical analyses were performed using the Graphpad Prism Demo 5 software. The ANOVA test, followed by the Turkey test, were used to calculate and compare the averages. The degree of significance has been set at 5%.

2.5 Ethical Considerations

The study was conducted in accordance with the Helsinki 2000 Declaration on HIV and AIDS Research in Poor Countries and in accordance

with local legislation on the National Program for the Care of People Living with HIV / AIDS (Decree No. 411 of 23 December 2001). Furthermore, for the research, consent was obtained from individuals for the use of their blood samples collected during biological monitoring.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Characteristics of the Study Population

The average age of the study population is 39 years for treated people living with HIV (PLHIV) and 32 years for untreated PLHIV with extremes of 18 to 49 years. The mean age of the control was 31 years with extremes of 18 to 49 years (Table 1).

3.2 Biochemical Profile of the Study Population

Among the biochemical parameters analysed (Calcium, Phosphorus, Magnesium, Alkaline Phosphatases, Alanine aminotransferase, Glycemia, Creatinine, Urea), only phosphorus was significantly higher in treated PLHIV (2.55 ± 0.37 , $P < 0.0001$) and in untreated PLHIV (1.97 ± 0.25 , $P < 0.0001$) than in controls (1.19 ± 0.03). The other values were in the range of the reference values (Table 1).

3.3 Vitamin D and Parathyroid Status of the Study Population

In this study, a deficiency (< 20 ng/mL) of 25-hydroxyvitamin D₃ was observed in 12% (19/163) of HIV-negative controls, 50% (60/120) in PLHIV on ART and 12% (5/43) in PLHIV without ART. Similarly, insufficiency (20-30 ng/mL) of 25-hydroxyvitamin D₃ was noted in 44% (72/163) of the controls, 33% (40/120) of the PLHIV under ART and 42% (18/43) PLHIV without ART. Finally, normal mean values (≥ 30 ng / mL) of 25-OH vitamin D₃ were obtained in 44% (72/163) of controls, 17% (20/120) of PLHIV on ART and 46% (20/43) PLHIV without ART (Table 2). Regarding PTH level, only 10% (12/120) of PLHIV on ART experienced hypoparathyroidism (< 10 pg/mL). Table 2 also shows a normal level (10-65 pg/mL) of PTH in 96% (157/163) of HIV-negative controls and in almost all PLHIV without ART (100%, 43/43). Hyperparathyroidism was observed in 4% (6/163) of HIV-negative controls compared to 3% (4/120) of PLHIV on ART.

3.4 Vitamin D and Parathyroid Status According to CD4 T cell Level

In patients without ART, a decrease in mean values of 25-OH vitamin D₃ according to the degree of immunodepression was observed. However, in patients on triple therapy, mean 25-OH vitamin D₃ concentrations are within the normal range for CD4 + T cell count greater than 500 cells/mL (32 ± 2.41 ng/mL) and those between 349 - 200 cells / mL (31 ± 2.29 ng/mL). However, a 25-hydroxyvitamin D₃ deficiency was found in CD4 + T cell count between 499 - 350 cells / mL (23 ± 1.14 ng/mL) and below 200 cells / mL (20 ± 1.03 ng/mL) (Fig. 1a). As for parathyroid hormone, mean concentrations are normal for all CD4 + T cell count and the presence or absence of ART (Fig. 1b).

3.5 Vitamin D and Parathyroid Status According to Age

In the 18-25 age group, untreated patients have a normal 25 (OH) D₃ concentrations (27 ± 0.56 ng/mL) but high when compared to controls and treated patients (16 ± 0.66 ng/mL). However, the control populations have 25 (OH) D₃ insufficiency, whereas the treated patients have deficiency in 25 (OH) D₃ (Fig. 2a). For parathyroid hormone, concentrations were normal but slightly higher in treated patients (20 ± 1.47 pg/mL) than in controls (19 ± 1.02 pg/mL) and in patients without treatment (16 ± 0.73 pg/mL) (Fig. 2b).

In the 26-34 age group, treated patients and untreated patients showed 25 (OH) D₃ deficiency respectively (29 ± 2.98 ng/mL; 26 ± 0.67 ng/mL) compared to controls (31 ± 1.05 ng/mL) (Fig. 2a). In contrast, concentrations of PTH were lower (7 ± 0.56 pg/mL) in treated patients than in controls (26 ± 2.28 pg/mL) but normal in untreated patients (30 ± 2.27 pg/mL) (Fig. 2b).

In the 35-49 age group, 25 (OH) D₃ deficiency was observed in treated patients (24 ± 1.84 ng/mL) compared to controls (31 ± 1.99 ng/mL). 25 (OH) D₃ levels were normal in untreated patients (34 ± 2.42 ng/mL) (Fig. 2a). PTH mean values in controls (29 ± 3.35 pg/mL), treated patients (28 ± 2.39 pg/mL) and untreated patients (28 ± 2.45 pg/mL), were in the range of normal reference values (Fig. 2b).

4. DISCUSSION

In this study, the average ages are 38 years for treated PLHIV and 31 years for untreated PLHIV.

The population affected by HIV infection is young, more sexually active and economically active [20]. In Spain, an average age of 37 years has been reported [21]. A similar study conducted with a population aged 18 to 60 found an average age of 36 years [22].

The primary function of 25 (OH) D is the regulation of calcium and phosphate homeostasis [10]. In this our study, calcium levels are normal, however we observed hyperphosphatemia in all HIV-infected individuals. This confirms the disruption of phosphocalcic balance reported by Boyvin et al. [6]. This situation is thought to be due to vitamin D deficiency [23] as observed in this study among PLHIV. The hyperphosphatemia is thought to be due to a low serum concentration of parathyroid hormone (PTH) and the inhibitory action of FGF-23 on α -1-hydroxylase. As a result, there will be no phosphate reabsorption in the proximal tubule [24]. The hyperphosphatemia observed in some PLHIV could also be due to the release of phosphorus into the bloodstream after bone resorption [25]. Thus, a direct effect of HIV on osteogenic cells has been reported, persistent activation of pro-inflammatory cytokines, upregulation of TNF-alpha that induces apoptosis in the osteoblast model [26]. In addition, although HIV-infected patients in this study had serum creatinine levels within normal range, subclinical renal dysfunction affecting hydroxylation can't be ruled out [23]. Indeed, the metabolism of vitamin D and that of parathyroid hormone are linked [27]. The hydroxylation of 25 (OH) D₃ to 1,25 (OH)₂ D₃ is strictly regulated by PTH, calcium and phosphorus to prevent the development of hypercalcemia. In addition, calcium reabsorption in the kidney is stimulated by 1,25 (OH)₂ D₃ under the influence of PTH [28]. However, the parathyroid hormone concentrations in this study are normal. They could not therefore be involved in this disruption of the phosphocalcic balance.

This 25 (OH) D₃ deficiency affected 50% of treated PLHIV and approximately 12% of untreated PLHIV. These results are similar to those of Ansemant et al.[29] who reported a deficiency of 25 (OH) D₃ in 50% of treated PLHIV. Similarly, a deficiency was observed in approximately 12% of HIV negative controls and insufficiency in 44% of controls. Sufficiency in 25 (OH) vitamin D reserves observed in our study could be explained due to the fact that Côte d'Ivoire is a tropical country with heavy sunshine, the major intakes pathway of vitamin D is through

Table 1. Mean values of biological parameters of the study population

Parameters	Control (N=163)	Treated patients (N=120)	Untreated patients (N=43)	P value a	P value b	P value c
Age (years)	31 ± 0.67	39 ± 0.63	32 ± 1.23	< 0.0001*	0.3169	< 0.0001*
Alkaline Phosphatase (40 – 129 UI/L)	77± 1.75	122±16.84	100 ± 5.18	0.0026*	< 0.0001*	0.2954
Calcium (2.2 – 2.7 mmol/L)	2.5± 0.04	2.9 ± 0.04	2.7 ± 0.04	< 0.0001*	0.0163*	0.0030*
Phosphorus (0.90 – 1.45 mmol/L)	1.19±0.03	2.55± 0.37	1.97 ± 0.25	< 0.0001*	< 0.0001*	0.1948
Magnesium (0.65 – 1.15 mmol/L)	0.78± 0.01	0.86± 0.01	0.78 ± 0.02	< 0.0001*	0.6594	0.0002*
Alanine aminotransferase (7 - 48 UI/L)	17 ± 1.00	23 ± 1.63	18 ± 0.83	0.0031*	0.8027	0.0171*
Glycemia (4.16 - 6.11 mmol/L)	5.00 ± 0.11	4.95±0.05	4.84 ± 0.11	0.8279	0.5521	0.4240
Creatinine (53 - 106 µmol/L)	70.8 ±1.59	70.8± 2.30	70.8 ± 2.74	0.6113	0.6653	0.4389
Urea (1.66 - 5.83 mmol/L)	4.65 ± 0.17	4.48±0.33	3.82 ± 0.33	0.4652	0.0065*	0.1772

a: Control versus treated Patients; b: Control versus untreated Patients; c: Treated Patients versus Untreated Patients; * Pdenotes statistically significant value; The difference is significant for P< 0.05

Table 2. Distribution of the study population according to 25 (OH) D₃ and parathyroid hormone status

Parametres	Control (N=163)		Treated Patients (N=120)		Untreated patients (N=43)	
	Number (%)	Mean value	Number (%)	Mean value	Number (%)	Mean value
25 (OH) D₃						
Deficiency < 20 ng/mL	19 (12 %)	14 ± 0.51	60 (50 %)	16 ± 0.46	5 (12 %)	19 ± 0.12
Insufficiency 20 - 30 ng/mL	72 (44 %)	28 ± 0.28	40 (33 %)	26 ± 0.35	18 (42 %)	26 ± 0.37
Sufficiency ≥ 30 ng/mL	72 (44 %)	38 ± 0.96	20 (17 %)	44 ± 1.40	20 (46 %)	50 ± 1.65
Parathyroid hormone						
Insufficiency < 10 pg/mL	0 (0 %)	0	12 (10 %)	7 ± 0,21	0 (0 %)	0
Normal 10 - 65 pg/mL	157(96 %)	25 ± 1.69	104 (87 %)	28 ± 1.95	43 (100 %)	25 ± 2.09
Elevated > 65 pg/mL	6 (4 %)	80 ± 0.15	4 (3 %)	102 ± 0.18	0 (0 %)	0

Normal reference value of 25 (OH) D₃: 30 – 100 ng/mL

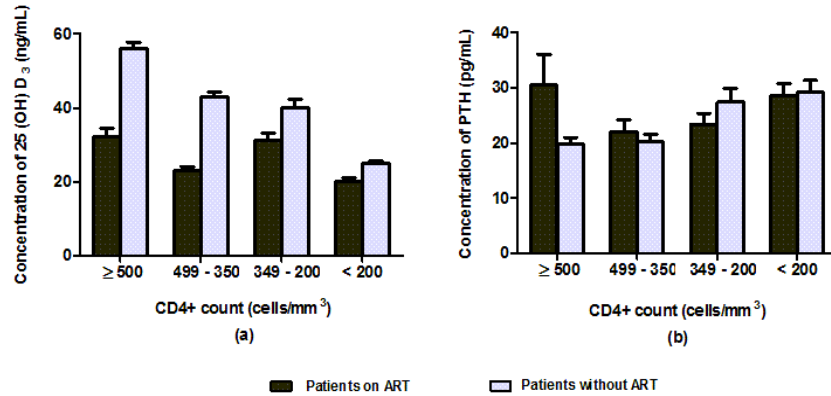


Fig. 1. 25 (OH) D₃ (a) and PTH (b) status according to CD4+ count

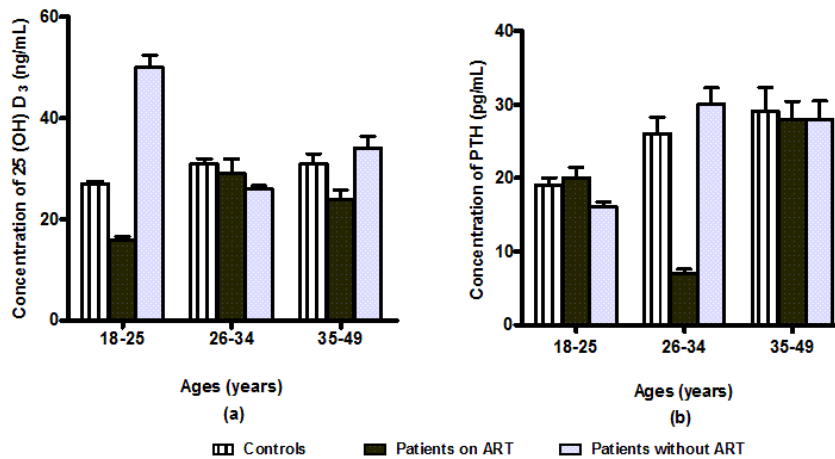


Fig. 2. 25 (OH) D₃ (a) and PTH (b) status according to ages

skin synthesis [30,31]. But the deficiency cases observed in control subjects may be due to the consumption of diets poor in vitamin D or other factors, since its supply has two sources (food and synthesis) [32]. Hypovitaminosis D is a global disorder, with a high prevalence in the population from the developing and western countries [33]. Beyond genetic, racial, geographic and seasonal differences, this deficiency is thought to be due to insufficient consumption of foods containing vitamin D (e.g milk and dairy products, fish, eggs and enriched orange juice) [34]. Furthermore, other factors such as female sex, age, dark skin pigmentation, body mass index (BMI), gastrointestinal absorption disorders -intestinal, risk factors for multiple cardiovascular diseases, including diabetes mellitus, co-infections including HIV / tuberculosis (TB), HIV / hepatitis C virus (HCV),

renal and/or hepatic pathologies such as cholestatic hepatitis and current alcohol consumption are cited as risk factors for traditional hypovitaminosis D in seropositive and seronegative cohorts [13]. According to studies, even healthy people, exposed to adequate sunlight, can't synthesize enough vitamin D without supplementation [35,36]. Moreover, 25 (OH) D₃ insufficiency was found in 33% of treated PLHIV and 42% of untreated PLHIV. Gichuhi et al. [37] also found 25 (OH) D₃ insufficiency in 32.78% of treated PLHIV and 35.09% of untreated PLHIV. Indeed, in case of advanced HIV infection, a proinflammatory state is observed. Certain cytokines (INF-Y, IL-4) which are then secreted interact with cytochrome CYP27B1 which is a catalyst for renal 1 α -hydroxylase [38]. This study showed insufficiency and deficiency in 25 (OH) D₃ in

treated PLHIV, in the range of CD4 T cell count of 499 - 350 cells / mL and less than 200 cells / mL respectively.

In this range of CD4, the occurrence of opportunistic infections highly increases the production of pro-inflammatory cytokines including TNF alpha (Tumor Necrosis Factor alpha) which inhibit 1-alpha -hydroxylase at the renal level thus stopping the transformation of 25 (OH) 2 vitamin D into its active form 1-25 (OH) vitamin D [39]. But also antiretroviral drugs especially IP and INNTI are highly inhibitory of cytochrome P450 and 25- and 1-alpha-hydroxylase enzymes [40]. Indeed, vitamin D is essential for maintaining phosphocalcic homeostasis. It also exhibits an immune defense regulatory activity and the ability to modulate the differentiation and proliferation of certain cell types that expresses the vitamin D receptor (VDR).

Untreated patients also showed insufficiency in 25 (OH) D₃ in the CD4 + T cell count range of less than 200 cells / mL. In general, in this range of CD4 T cells, infectious complications resulting from poor immunity require hospital care, which significantly reduces the duration of sun exposure for patients. Moreover, these infectious complications and hospitalization can lead to malnutrition and decreased oral consumption of certain foods containing vitamin D [13].

Therefore, this deficiency or insufficiency of vitamin D would disrupt immune system function and response. It would precipitate the destruction of CD4 and the progression of the disease [41]. Other authors have also found a positive association between vitamin D and CD4 counts [42]. In addition, deficiency in circulating vitamin D₃ could also be explained by variations in the locus encoding Vitamin D Receptor (VDR) during HIV infection [43]. VDR dysfunction related to 25 (OH) D₃ deficiency [44] is associated with progression of HIV infection [43,45].

In the present study, hypoparathyroidism (< 10 pg/mL) was observed only in 10 % (12/120) of treated patients. It should be noted that a decrease in the rate of PTH has already been reported in HIV infected patients [46]. The mechanism could be related to antibodies against parathyroid cells. Using anti-Leu3a, a monoclonal antibody that recognizes CD4, it has been found that HIV-positive patients have a CD4 molecule on the surface of parathyroid cells,

indicating the possibility of functional inhibition by antibody anti-CD4 or direct HIV infection [47]. In addition, TNF-α appears to interfere with the stimulatory effect of PTH by mechanisms involving downregulation of PTH receptors, alteration of protein kinase C activity, and inhibition of cAMP response after PTH stimulation [23]. In addition, hyperparathyroidism was observed in 3% (4/120) of treated PLHIV against 4% (6/163) in HIV- negative controls. Studies have indicated that even a slight reduction in 25 (OH) D₃ serum levels may be associated with secondary hyperparathyroidism, increased bone renewal, and accelerated bone loss. This increases the risk of bone fractures [48]. In this study, the level of PTH is normal in all ranges of CD4 + T cells count in both treated and untreated patients. Although a high PTH concentration is considered characteristic of hypovitaminosis D, a "normal" concentration of PTH can be found in subjects classified as "vitamin D deficient". Therefore, although many subjects with 25 (OH) D₃ serum levels below the threshold may have PTH in the "normal" reference range, they may have "functional hyperparathyroidism" [49]. Thus, hypovitaminosis D may be considered a major risk factor for bone health [50].

5. CONCLUSION

This study showed that parathyroid hormone levels were normal in the population. They could not therefore be involved in phosphocalcic balance disruption. Furthermore, 25 (OH) D₃ deficiency was more common in treated patients, especially those with CD4 counts below 200 cells / mm³ and age range 18-25 years. This disruption of 25 (OH) D₃ could be due to insufficient dietary intake of vitamin D-rich foods and not a parathyroid hormone-related defect. Deficiency of 25 (OH) D₃ could also be due to dysfunction of the vitamin D nuclear receptor (VDR). It would be interesting to further study the nuclear receptor of vitamin D (VDR).

ETHICAL APPROVAL

The study was conducted in accordance with the Helsinki 2000 Declaration on HIV and AIDS Research in Poor Countries and in accordance with local legislation on the National Program for the Care of People Living with HIV/AIDS (Decree No. 411 of 23 December 2001). Furthermore, for the research, consent was obtained from individuals for the use of their blood samples collected during biological monitoring.

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

1. WHO. Global health sector strategy on HIV 2016-2021, Geneva 27 Switzerland. WHO/HIV/2016.05; 2017. (Accessed 14 October 2017) Available:<http://www.who.int/hiv/strategy2016-2021/ghss-hiv/en/>
2. UNAIDS. Global report epidemiology slides, in core epidemiology slides, Geneva. World Health Organization. 2013; 274. (Accessed 11 September 2015) Available:http://www.unaids.org/en/resources/documents/2017/20170720_Core_epidemiology_slides
3. UNAIDS. Country fact sheets Côte d'Ivoire 2016: HIV and AIDS Estimates; 2016. (Accessed 14 October 2017) Available:<http://www.unaids.org/fr/regionscountries/countries/ctedivoire>
4. Shin DH, Martinez SS, Parsons M, Jayaweera DT, Campa A, Baum MK. Relationship of oxidative stress with HIV disease progression in HIV/HCV Co-infected and HIV mono-infected adults in Miami. *Intern J Biosci Biochem Bioinform.* 2012;2:217-23.
5. Marco B, Davide G, Fabio V, Elisa D, Laura C, Carlo B, et al. Metabolic bone disease in HIV infection. *Editorial Review.* 2009;23:1297-1310.
6. Boyvin L, Aké JA, Séri KL, M'Boh GM, Yapo AF, Djaman JA. 25 (OH) Vitamin D level and calcium/phosphorus metabolism disorders in patients living with HIV in Abidjan. *Int J Biochem Res Rev.* 2017; 17(4):1-7.
7. Milovanova L, Milovanov Y, Plotnikova A. Phosphorus and calcium metabolism disorders associated with chronic kidney disease stage III-IV (Systematic review and meta-analysis). In *Tech.* 2012;95-119.
8. Michels TC, Kelly KM. Parathyroid disorders. *American Family Physician.* 2013;88(4):249-57.
9. Carlberg C, Seuter S, De Mello VDF, Schwab U, Voutilainen S, Pulkki K, et al. Primary vitamin D target genes allow a categorization of possible benefits of vitamin D3 supplementation. *Plos One.* 2013;8:1-7.
10. Schuch NJ, Garcia VC, Vívoló SRGF, Martini LA. Relationship between Vitamin D receptor gene polymorphisms and the components of metabolic syndrome. *J Nutr.* 2013;12:1-96.
11. Chaves HL, Moreira HP, Corrêa HAH, Machado WBO, Teles RB, Nascimento LR, et al. Vitamin D and secondary hyperparathyroidism in HIV infected patients taking antiretroviral therapy. *World Journal of AIDS.* 2014;4:430-37.
12. Nolan DJ, Rose R, Rodriguez PH, Salemi M, Singer EJ, Lamers SL, et al. The spleen is an HIV-1 sanctuary during combined antiretroviral therapy. *AIDS Research and Human Retroviruses.* 2018;34(1):123-25.
13. Mansueto P, Seidita A, Vitale G, Gangemi S, Iaria C, Cascio A. Vitamin D deficiency in HIV infection: Not only a bone disorder. *Biomed Res Int;* 2015. Article ID 735615.
14. Crucitti T, Taylor D, Beelaert G, Fransen K, Damme LV. Performance of a rapid and simple HIV testing algorithm in a multicenter phase III microbicide clinical trial. *Clin. Vaccine Immunol.* 2011;18(9): 1480–1485.
15. Sagar NA, Sen M, Yadav VK. Serodiagnosis of HIV by rapid test and ELISA test assay in a tertiary care centre in Northern India. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 2015;4(10):623-29.
16. Ormerod MG, Imrie PR. *Flow cytometry, USA, ed.* Human Press; 1990.
17. Zaman Z, Fielden P, Frost PG. Simultaneous determination of vitamins A and E and carotenoids in plasma by reversed-phase HPLC in elderly and younger subjects. *Clin Chem.* 1993;39: 2229-2234.
18. Souberbielle JC, Brazier F, Piketty ML, Cormier C, Minisola S, Cavalier E. How the reference values for serum parathyroid hormone concentration are (or should be) established? *J Endocrinol Invest.* 2016; 1-16.
19. Deyhimi F, Arabieh M, ParvinL. Optimization of the Emerson-trinder enzymatic reaction by response surface methodology. *Biocatalysisand Bio Transformation.* 2006;24:263-71.
20. Boyvin L, M'Boh G, Ake-Edjeme A, Soumahoro-Agbo MK, Séri KL, Djaman J. Serum level of two antioxidant vitamins (A and E) in Ivorian (Côte d'Ivoire) people living with human immunodeficiency virus.

- Annals of Biological Research. 2013;4(11): 48-4.
21. Luis DA, Bachiller P, Aller R, de Luis J, Izaola O, Terroba MC, et al. Relation among micronutrient intakes with CD4 count in HIV infected patients. *Nutricion Hospitalaria*. 2002;17:285-89.
 22. Ademasu A, Kerisew B, Nibret E, Munshea A, Adal M. Serum Zinc Deficiency and associated factors among preart and on-ART adults at Felegehiwot referral hospital, Bahir Dar, Northwest Ethiopia. *Int J Nutr Food Sci*. 2014;3:311-17.
 23. Haug CJ, Aukrust P, Haug E, Mørkrid L, Müller F, Frøland SS. Severe deficiency of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human immunodeficiency virus infection: Association with immunological hyperactivity and only minor changes in calcium homeostasis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83 (11):3832-3838.
 24. Moges B, Amare B, Yabutani T, Kassu A. HIV associated hypocalcaemia among diarrheic patients in northwest Ethiopia: A cross sectional study. *BMC Public Health*. 2014;14:679.
DOI: 10.1186/1471-2458-14-679
 25. Indridason OS, Quarles LD. Hyperphosphatemia in end-stage renal disease. *Adv Ren Replace Ther*. 2002; 9(3):184-92.
 26. Brown TT, Qaqish RB. Antiretroviral therapy and the prevalence of osteopenia and osteoporosis: A meta-analytic review. *AIDS*. 2006;20:2165-2174.
 27. Sai AJ, Walters RW, Fang X, Gallagher JC. Relationship between vitamin D, parathyroid hormone and bone health. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(3):1-11.
 28. Hileman CO, Overton ET, Mc Comsey GA. Vitamin D and bone loss in HIV. *Curr Opin HIV AIDS*. 2016;11(3):277–84.
 29. Ansemant T, Mahy S, Piroth C, Ornetti P, Ewing S, Guillaud JCI, et al. Severe hypovitaminosis D correlates with increased inflammatory markers in HIV infected patients. *BMC Infectious Diseases*. 2013;13(7):1-7.
 30. Kim JH, Gandhi V, Pseudos GJR, Espinoza F, Park J, Sharp V. Evaluation of vitamin D levels among HIV-infected patients in New York City. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012;28:235-241.
 31. Norval M, Coussens AK, Wilkinson RJ, Bornman L, Lucas RM, Wright CY. Vitamin D status and its consequences for health in South Africa. *Int J Environ Res Public Health*. 2016;13(10):1019.
DOI: 10.3390/ijerph13101019 20
 32. Dougherty KA, Schall JI, Zemel BS, Tuluc F, Hou X, Rutstein RM, et al. Safety and efficacy of high-dose daily vitamin D3 supplementation in children and young adults infected with human immunodeficiency virus. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2014;3(4):294-303.
 33. Arabi A, El Rassi R, El-Hajj FG. Hypovitaminosis D in developing countries-prevalence, risk factors and outcomes. *Nat Rev Endocrinol*. 2010;6: 550-61.
 34. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007;357:266-81.
 35. Mangin M, Sinha R, Fincher K. Inflammation and vitamin D: The infection connection. *Inflamm. Res. Inflammation Research*. 2014;63:803-19.
 36. Coussens AK, Naude CE, Goliath R, Chaplin G, Wilkinson RJ, Jablonski NG. High-dose vitamin D3 reduces deficiency caused by low UVB exposure and limits HIV-1 replication in urban Southern Africans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015; 112(26):8052-8057.
 37. Gichuhi CW, Kariuki D, Nyerere A, RiyatM. Studies on Vitamin D levels in serum of HIV infected patients: Their effect on progression towards AIDS. *World Journal of AIDS*. 2014;4:422-29.
 38. White J. Regulation of intracrine production of 1,25-dihydroxyvitamin D and its role in innate immune defense against infection. *Arch Biochem Biophys*. 2012; 523:58-3.
 39. Conesa-Botella A, Mathieu C, Colebunders R, Moreno-Reyes R, Van Etten E, Lynen L, et al. Is vitamin D deficiency involved in the immune reconstitution inflammatory syndrome? *AIDS Res Ther*. 2009;21;6:4.
DOI: 10.1186/1742-6405-64
 40. Conesa-Botella A, Florence E, Lynen L, Colebunders R, Menten J, Moreno-Reyes R. Decrease of vitamin D concentration in patients with HIV infection on a non nucleoside reverse transcriptase inhibitor-containing regimen. *AIDS Res Ther*. 2010;7:40.
 41. Stein EM, Yin MT, McMahan DJ, Shu A, Zhang CA, Ferris DC, et al. Vitamin D deficiency in HIV-infected postmenopausal

- Hispanic and African-American women. *Osteoporos Int.* 2011;22(2):477-87.
43. Kim JH, Gandhi V, Pseudos Jr. G, Espinoza F, Park J, Sharp V. Evaluation of vitamin D levels among HIV-infected patients in New York City. *AIDS Research and Human Retroviruses.* 2011;28:235-41.
 44. Nieto G, Barber Y, Rubio MC, Rubio M, Fibla J. Association between AIDS disease progression rates and the Fok-I polymorphism of the VDR gene in a cohort of HIV-1 seropositive patients. *J Steroid Biochem.* 2004;89(90):199-07.
 45. Waterhouse JC, Perez TH, Albert PJ. Reversing bacteria-induced 25-hydroxy-vitamin D receptor dysfunction is key to autoimmune disease. *Ann NY Acad Sci.* 2009;1173:757-65.
 46. Sánchez de la Torre M, Torres C, Nieto G, Vergara S, Carrero AJ, Macías J, Pineda JA, Caruz A, Fibla J. Vitamin D receptor gene haplotypes and susceptibility to HIV-1 infection in injection drug users. *J Infect Dis.* 2008;197:405-10.
 47. Cherqaoui R, Shakir KMM, Shokrani B, Madduri S, Farhat F, Mody V. histopathological changes of the thyroid and parathyroid glands in HIV-infected patients. *Journal of Thyroid Research.* 2014;7.
DOI: org/10.1155/2014/364146
 48. Hellman P, Karlsson-Parra A, Klareskog L, Ridefelt P, Bjerneroth G, Rastad J, et al. Expression and function of a CD4-like molecule in parathyroid tissue. *Surgery.* 1996;120:985-92.
 49. Adams JS, Hewison M. Update in vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:471-78.
 50. Okazaki R, Sugimoto T, Kaji H, et al. Vitamin D insufficiency defined by serum 25-hydroxyvitamin D and parathyroid hormone before and after oral vitamin D3 load in Japanese subjects. *J Bone Miner Metab.* 2011;29:103-10.
 51. Mori H, Okada Y, Tanaka Y. Incidence of Vitamin D deficiency and its relevance to bone metabolism in Japanese post-menopausal women with type 2 diabetes mellitus. *Intern Med.* 2015;54:1599-1604.

© 2018 Aké et al.; This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Peer-review history:
The peer review history for this paper can be accessed here:
<http://www.sciencedomain.org/review-history/24370>

RESUME

L'objectif général de cette étude était d'analyser le polymorphisme allélique du récepteur de la vitamine D (VDR) en relation avec les concentrations en 25 (OH) D₃ pour le déficit en vitamine D₃ afin d'une meilleure prise en charge des personnes vivant avec le VIH (PVVIH) en Côte d'Ivoire. Pour y arriver, un des volets importants de cette recherche a consisté à déterminer le statut en 25 (OH) D₃ et en parathormone, à décrire le polymorphisme de 4 portions du gène du récepteur de la vitamine D₃ et à analyser l'association entre le polymorphisme du gène VDR de la vitamine D, les concentrations en 25 (OH) D₃ et le degré de l'immunodépression. Cette étude a porté sur 326 échantillons de sang d'individus adultes (163 PVVIH et 163 témoins VIH-) âgés de 18 à 49 ans dont 50 (32 patients VIH positif et 18 témoins VIH négatif) ont été utilisés pour l'étude du polymorphisme du gène du récepteur de la vitamine D. Le comptage des lymphocytes T CD4+ a été fait par cytométrie en flux (FacsCalibur). La 25 (OH) D₃ a été dosée par chromatographie liquide de haute performance (CLHP). Les produits de PCR obtenus après amplification des extraits d'ADN génomique des cellules mononucléaires du sang périphérique (CMSP) ont été purifiés et séquencés. Les concentrations moyennes de parathormone étaient normales dans l'ensemble. Par contre, un déficit en 25 (OH) D₃ a été observé chez les patients traités, âgés de 35 à 49 ans ayant des taux de CD4+ inférieurs à 200 cellules/mm³ sous AZT-3TC-EFV ou AZT-3TC-NVP et ceux âgés de 18 à 25 ans sous AZT-3TC-NVP. De plus, des niveaux suffisants de 25 (OH) D₃ ont été observés chez les patients traités avec TDF-3TC-LPV/r. L'étude du gène du récepteur de la vitamine D₃ (VDR) a montré que les polymorphismes affectant les fragments Fok-1, Bsm-1 et Apa-1 étaient plus rencontrés parmi les infectés VIH positif. Les polymorphismes affectant les fragments Fok-1, Bsm-1 et Apa-1 étaient associés aux concentrations de la 25 (OH) D₃ et également à l'activité du VDR. En conclusion, les patients infectés par le VIH, et sous traitement antirétroviral constituent une population à haut risque de déficience ou d'insuffisance de vitamine D₃. Cette perturbation de la concentration de 25 (OH) D₃ pourrait être due à un apport nutritionnel insuffisant en aliments riches en vitamine D, au traitement antirétroviral et aux polymorphismes affectant les fragments Fok-1, Bsm-1 et Apa-1 et non à un défaut lié à la parathormone.

Mots clés : 25 (OH) D₃, Côte d'Ivoire, Parathormone, PVVIH, traitement antirétroviral, polymorphisme du gène du VDR.

ABSTRACT

The main goal of this study is to contribute to better care for people living with HIV (PLHIV) in Côte d'Ivoire through the analysis of the allelic polymorphism of the vitamin D₃ receptor (VDR) in relationship with 25 (OH) D₃ concentrations. To achieve this, an important component of this research is to determine the 25 (OH) D₃ and parathyroid hormone status, to describe the polymorphism of 4 portions of the vitamin D₃ receptor gene and to analyse the association between the polymorphism of the VDR gene of vitamin D, the concentrations of 25 (OH) D₃ and the degree of immunosuppression. This study included 326 blood samples from adult individuals (163 PLHIV and 163 HIV- controls) aged 18 to 49 years of which 50 (32 HIV-positive patients and 18 HIV-negative controls) were used for the study of vitamin D receptor gene polymorphism. The CD4+ lymphocyte count was done by flow cytometry (FacsCalibur). 25 (OH) D₃ was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The PCR products obtained after amplification of genomic DNA extracts from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) have been purified and sequenced. Mean concentrations of parathyroid hormone were normal in the whole thing. In contrast, a 25 (OH) D₃ deficiency was observed in treated patients aged 35 to 49 years with CD4+ less than 200 cells/mm³ under TDF-3TC-EFV or AZT-3TC-NVP and those aged 18 to 25 years under AZT-3TC-NVP. In addition, sufficient levels of 25 (OH) D₃ were observed in patients treated with TDF-3TC-LPV/r. The study of the vitamin D₃ receptor (VDR) gene has shown that polymorphisms affecting the Fok-1, Bsm-1 and Apa-1 fragments were more common among HIV-positive infected people. The polymorphisms affecting the Fok-1, Bsm-1 and Apa-1 fragments were associated with 25 (OH) D₃ concentrations and also with VDR activity. In conclusion, HIV-infected patients on antiretroviral treatment constitute a population at high risk of deficiency or insufficiency of vitamin D₃. This disruption of the 25 (OH) D₃ concentration could be due to insufficient nutritional intake by foods rich in vitamin D, antiretroviral treatment and polymorphisms affecting the Fok-1, Bsm-1 and Apa-1 fragments and not a defect related to the parathyroid hormone.

Keywords : 25 (OH) D₃, antiretroviral treatment, Côte d'Ivoire, Parathyroid hormone, PLHIV, VDR gene polymorphism.