

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur Et de la Recherche Scientifique

Université SAAD DAHLEB-BLIDA.



Faculté des Sciences Agro-vétérinaires et Biologiques  
Département de Biologie

## MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER EN SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE

*Filière : Biologie*  
*Option : Génétique et physiologie*

Thème

**Western blot indéterminé : analyse et  
interprétation par la PCR dans le diagnostic de  
l'infection à VIH**

Présenté par :

❖ M<sup>elle</sup> BOUMAHDY Hayet

Date de soutenance :

19/12/2013

Devant le jury :

M <sup>ME</sup> BEN AZOUZ F.	Maitre assistante à l'université de Blida	Présidente
M <sup>F</sup> BENYAHYA N.	Maitre-assistant à l'université de Blida	Examineur
M <sup>ME</sup> AMOUKRANE A.	Maitre assistante à l'université de Blida	Examinatrice
M <sup>ME</sup> BOUZGHOUB S.	Professeur à l'université d'Alger	Promotrice
M <sup>F</sup> BESSAAD M.A.	Maitre-assistant à l'université de Blida	Co-promoteur

*Promotion : 2012 /2013*

## ***REMERCIEMENTS***

---

### ***Au terme de ce travail***

Je remercie en premier lieu, **Dieu** le Tout Puissant, de m'avoir illuminé et ouvert les portes du savoir et de m'avoir donné le courage et la volonté pour bien mener ce travail.

En second lieu, je tiens à remercier vivement ma promotrice **Pr. BOUZEGHOUB S.**  
qui a bien voulu par son aimable bienveillance diriger ce travail.

Je voudrais également lui témoigner ma profonde gratitude pour sa patience et son soutien.

Je tiens à exprimer ma gratitude et mes vifs remerciements à mon co-promoteur  
**Mr BESSAAD A.** pour toute son aide et tout le temps qu'il a bien voulu m'accorder.

Je remercie **Mme BEN AZOUZ F.** D'avoir accepté de présider le jury de ma soutenance.

Je remercie **Mr BENYAHEYA N.** et **Mme AMOKRANE A.** d'avoir accepté d'examiner  
mon travail.

Je remercie également tous les enseignants du département de biologie ainsi que tout le personnel de l'institut Pasteur d'Algérie annexe Sidi Fredj de laboratoire VIH et surtout  
**Mr CHEROUF A.** et **Melle BELMAHFOUDH S.** pour toute l'aide et tout le temps  
qu'ils ont bien voulu m'accorder.

*Merci* 

## *DEDICACE*



Il est naturel que ma pensée la plus forte aille vers ma mère, à qui je dois la vie et une part essentielle de ma personnalité. Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et prier pour moi.

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse dieu le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

Ce travail est dédié à mon défunt père BOUMAHDI MOHAMED, aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi. J'espère que, du monde qui est sien maintenant, il apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'une fille qui a toujours prié pour le salut de son âme. Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde.

Je dédie également ce travail avec tous mes vœux de bonheur et de santé à ma très chère sœur FARIDA, mon très cher frère KADER, à mon cher frère REDA ainsi que son épouse NABILA, et mon neveu qu'on attend tous avec impatience. Sans oublier mon petit ange NESREDDINE.

Je dédie ce travail aussi à ma deuxième famille GUEBBOUB ; tonton ALI, tata MALIKA, et mes sœurs HAYET, SABRINA et ZINEB.

A mes chères amies IMANE, RYM, ALDJIA pour l'aide, le soutien et l'encouragement qu'elles m'ont apporté.

L'ensemble de mes amis et collègues de promotion « Génétique et physiologie », je leur souhaite tout le succès du monde.

Et à tous ceux qui me sont chers et dont je n'ai pas cité le nom.



## RESUME

---

Le diagnostic biologique de l'infection VIH1/2 est essentiellement sérologique, il consiste à rechercher les anticorps anti VIH1/2 et/ou les antigènes viraux (la protéine p24) par différentes techniques immunoenzymatiques ou autres. Parmi les tests disponibles ; le Western blot demeure une technique de confirmation très spécifique, permettant de poser le diagnostic d'infection .Cependant, les résultats indéterminés obtenus par cette technique constituent un véritable problème d'interprétation, et engendrent un retard de diagnostic.

Le bût de ce travail vise essentiellement à étudier l'interprétation des profils indéterminés obtenus en Western Blot, par la recherche de l'ARN viral par PCR en temps réel.

L'analyse a été effectuée sur un total de 60 sérums préalablement analysés et trouvés indéterminés par le Western blot. Seul 31 sérums dont les résultats étaient positifs en MEIA, ont été analysés par d'autres tests : Elisa, Western blot et PCR.

Sur le total des 31 échantillons analysés par PCR, 30 étaient indétectables en ARN et un seul échantillon était positif en ARN.

L'absence d'ARN viral dans nos échantillons, confirme qu'il y a bien absence d'infection par ce virus, et par conséquent ces échantillons sont négatifs en anticorps anti-VIH.

La PCR a permis d'exclure l'infection VIH chez 30 sujets et, de confirmer la présence d'une infection VIH chez un seul patient.

Ce travail a montré l'intérêt de la PCR dans l'interprétation des profils indéterminés, et la place qu'occupe ce test dans la rapidité des résultats et dans la prise en charge immédiate du patient.

**Mots clés :** VIH1/2, western blot indéterminés, trace p24, PCR en temps réel, ARN viral.

## SUMMARY

---

The laboratory diagnosis of HIV-1 infection / 2 is mainly serological; it is for anti HIV1 / 2 antibodies and / or viral antigens (p24) by different technical or other immunoassays. Among the available tests, the Western blot technique remains a very specific confirmation test for the diagnosis of infection, however, indeterminate results obtained by this technique are a real problem of interpretation, and generate a delayed diagnosis.

The aim of this work is mainly to study the interpretation of indeterminate Western blot profiles obtained by the research of viral RNA by real-time PCR.

The analysis was performed on a total of 60 serums previously tested and found indeterminate by WB Only 31 serums which were positive in the MEIA results were analyzed by other tests: Elisa, PCR and WB.

Of the total 31 samples analyzed by PCR, 30 were undetectable in RNA and one sample was positive RNA.

The absence of viral RNA in our samples, confirming that there is no well infected with this virus, and therefore these samples are negative HIV Ab PCR allowed to exclude HIV infection in 30 subjects and confirm the presence of HIV infection in a single patient.

This work has demonstrated the usefulness of PCR in the interpretation of indeterminate profiles, and the place it in the speed test results and the supported immediate patient.

**Keywords:** HIV, western blot indeterminate p24 band, PCR, RNA.

## الملخص

التشخيص المخبري لعدوى HIV-1/2 هو في الأساس مصليا، يرتكز عن البحث على الأجسام المضادة للفيروس HIV-2/1 و/ أو مولدات المضادات الفيروسية ( بروتين P24 ) عن طريق عدة تقنيات مناعية و انزيمية او غيرها. من بين الاختبارات المتاحة، لا يزال Western blot تقنية للتأكيد محددة للغاية لتشخيص العدوى. ومع ذلك، النتائج الغير المحددة المتحصل عليها من قبل هذه التقنية هي المشكلة الحقيقية للتفسير وتسبب التأخير في التشخيص.

الهدف من هذا العمل هو أساسا دراسة تفسير النتائج الغير المحددة المتحصل عليها من قبل Western blot ويتم ذلك بالبحث عن الحمض النووي الريبي الفيروسي بواسطة تقنية PCR بالوقت الحقيقي.

تم إجراء التحليل على مجموع 60 مصل تم اختبارهم سابقا و وجدوا غير محددين من قبل Western blot. فقط 31 مصل كان إيجابي في نتائج MEIA ثم تم اعادة تحليلهم عن طريق اختبارات أخرى : Elisa ، Western blot و PCR .

من مجموع 31 عينة تم تحليلها بواسطة PCR ، 30 كانت نتيجتها سلبية و كانت عينة واحدة إيجابية.

غياب الحمض النووي الريبي الفيروسي في عيناتنا ، يؤكد غياب الإصابة بهذا الفيروس ، وبالتالي هذه العينات كانت سلبية عند الكشف بتقنية PCR .

سمحت لنا تقنية PCR باستبعاد الإصابة بفيروس نقص المناعة البشرية عند 30 عينة، وتأكيد وجود عدوى فيروس نقص المناعة البشرية عند مريض واحد.

وقد أثبت هذا العمل فائدة تقنية PCR في تفسير النتائج الغير محددة ، والمكانة التي تحتلها هذه الاخيرة في سرعة النتائج و الاعتناء بالمريض و تتبعه .

**الكلمات الرئيسية :** فيروس نقص المناعة البشرية ، نتائج western blot غير محددة ، بروتين P24 ، PCR ، الحمض النووي الريبي.

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

<b>Ac</b>	Anticorps
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucleaire
<b>ADNc</b>	Acide désoxyribonucléaire compléaire
<b>AES</b>	Accident d'exposition au sang
<b>Ag</b>	Antigène
<b>ARN</b>	Acide ribonucleaire
<b>AZT</b>	Azidothymidine
<b>CA</b>	Capside
<b>CCR5</b>	Cysteine-chymokine receptor type5
<b>CD4</b>	Cluster of differenciation 4
<b>CDC</b>	Centers for disease control
<b>CMH</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>CMV</b>	Cytomégalovirus
<b>CO</b>	Concentration Optique
<b>CPA</b>	Cellule présentatrice d'antigène
<b>CR</b>	Cellule réaction
<b>CRF</b>	Circulating recombinant form
<b>CTL</b>	Cytotoxic T lymphocyte
<b>CXCR4</b>	CX chemokine receptor type 4
<b>dNTPs</b>	Désoxynucléotides triphosphates
<b>E</b>	Echantillon
<b>ELISA</b>	Enzyme-inked-immun-sorbent-assay
<b>Env</b>	Enveloppe
<b>Gag</b>	Groupe antigène
<b>Gp</b>	Glycoprotéine
<b>HRP</b>	Horseradish peroxidase

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

<b>HTLVIII</b>	Human T lymphotropic virus
<b>IDR</b>	Intradermoréaction
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interféron gamma
<b>IgA</b>	Immunoglobuline A
<b>IgM</b>	Immunoglobuline M
<b>IgG</b>	Immunoglobuline G
<b>IL</b>	Interleukine
<b>INNTI</b>	Inhibiteurs non nucléotidiques de la transcriptase inverse
<b>INTI</b>	Inhibiteurs non nucléotidiques de la transcriptase inverse
<b>IP</b>	Inhibiteur de protéase
<b>LAV</b>	Lymphadenopathy associated virus
<b>LNR</b>	Laboratoire national de référence
<b>LT</b>	Lymphocyte T
<b>LTR</b>	Long terminal repeat
<b>MA</b>	Matrice
<b>MEIA</b>	Méthode immuno-enzymatique microparticulaire
<b>NC</b>	Nucléocapside
<b>Nef</b>	Negative factor
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear factor-kappa B
<b>NRC</b>	Contrôle non réactif
<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la santé
<b>P</b>	Protéine
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>Pol</b>	Polymérase

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

<b>QS</b>	Standard de quantification
<b>Rev</b>	Régulateur de l'expression virale
<b>RT</b>	Reverse transcriptase
<b>S</b>	Le ratio de la valeur de l'échantillon
<b>SI</b>	Système immunitaire
<b>SIDA</b>	Syndrome d'immunodéficience acquis
<b>SU</b>	Sous-unité
<b>Taq</b>	Thermophilus aquaticus
<b>Tat</b>	Transactivateur
<b>Th</b>	Cellule T helper
<b>TI</b>	Transcriptase inverse
<b>TM</b>	Transmembranaire
<b>TME</b>	Transmission mère-enfant
<b>V3</b>	Domaine de l'enveloppe du VIH-1
<b>VHB</b>	Virus de l'hépatite B
<b>VHC</b>	Virus de l'hépatite C
<b>Vif</b>	Virion infectivity factor
<b>VIH</b>	Virus d'immunodéficience humain
<b>Vpr</b>	Viral protein R
<b>Vpt</b>	Viral protein T
<b>Vpu</b>	Viral protein U
<b>Vpx</b>	Viral protein X
<b>WB</b>	WESTERN BLOT
<b>Z05</b>	Enzyme recombinante thermostable

## GLOSSAIRE

---

**ADN proviral** : résulte de la copie de l'ARN viral grâce à la transcriptase inverse et peut ainsi s'intégrer au génome de la cellule hôte par l'enzyme virale (intégrase).

**Avidine** : est une protéine présente dans le blanc d'œuf des oiseaux. Elle peut se fixer à la biotine (ou vitamine B8), ce qui empêche son assimilation par l'organisme, créant ainsi une carence.

**Biotine** : est une vitamine hydrosoluble ; c'est une coenzyme qui participe au métabolisme des acides gras, des glucides et des acides aminés, ainsi qu'à la biosynthèse des vitamines B<sub>9</sub> et B<sub>12</sub> ; La biotine est utilisée en biochimie expérimentale du fait de son affinité très élevée pour l'avidine.

**Centre germinatif** : Site d'intense prolifération, de sélection, de maturation et de mort des cellules B dans les organes lymphoïdes périphériques.

**Chimiokines** : cytokine de faible poids moléculaire qui sont impliquées dans la migration et l'activation des cellules du système immunitaire et sont retrouvées chez tous les vertébrés, certains virus et certaines bactéries.

**Épissage** : est un processus par lequel les ARN transcrits à partir de l'ADN génomique peuvent subir des étapes de coupure et ligature qui conduisent à l'élimination de certaines régions dans l'ARN final. Les segments conservés s'appellent des exons et ceux qui sont éliminés s'appellent des introns.

**Épitope** : région d'une molécule antigénique susceptible de s'associer ou site de liaison d'un anticorps.

**Hémophile** : patient atteint d'hémophilie qui est une anomalie constitutionnelle de la coagulation sanguine en rapport avec un déficit d'un des facteurs de la coagulation

**Immunodéficience** (ou immunodépression) : caractérise un état dans lequel une personne voit ses défenses immunitaires affaiblies.

**Indéterminé** : lorsque le résultat des tests sérologiques est discordant et il y a présence d'une trace d'Ac de l'une des protéines virales du HIV1-2 (P24 ou gp120 ou gp41...ect) par WB.

**Marqueurs sérologiques** : Produit chimique présent dans le sang dont la concentration est en rapport avec certaines situations physiologiques ou pathologiques qui est facilement détectable, par exemple anticorps-antigène.

**Peroxydase** : enzyme qui catalyse l'oxydation d'un substrat en utilisant le peroxyde d'hydrogène comme accepteur d'électrons.

**Pneumonie** : est une infection respiratoire aiguë affectant les poumons.

**Polymérase II** : est un complexe enzymatique responsable de la synthèse de l'acide ribonucléique, ou ARN, à partir d'une matrice d'ADN.

## GLOSSAIRE

---

**Rétrovirus** : Virus dont le génome est constitué d'ARN. Sa particularité est de posséder une "transcriptase inverse", enzyme qui permet la transcription de l'ARN viral du génome en molécule d'ADN "complémentaire" (ADNc) capable de s'intégrer à l'ADN de la cellule hôte. Il utilise ensuite la machinerie cellulaire pour se répliquer.

**Sarcome de kaposi** : est un type de tumeur cutanéemaligne qui se caractérise par des nodules rouge-bleu.

**Sécrétions cervicovaginales** : sont considérées comme le principal vecteur de la transmission du VIH de la femme infectée à son partenaire sexuel et/ou à son enfant en cas de transmission périnatale.

**Séroconversion** : passage, pour individu, de l'état séronégatif à séropositifs, traduisant l'exposition de l'Ag et la production de l'Ac spécifique.

**Syncytium** : est une région de cytoplasme contenant plusieurs noyaux.

**Thérapie antirétrovirale** : Médicaments utilisés dans le traitement de l'infection par le VIH. Ces médicaments ralentissent la réplication du virus et, par conséquent, sa propagation à l'intérieur du corps.

**Variations génétiques** : désigne le degré de variétés des gènes au sein d'une même espèce.

**Virion** : est un virus, ou particule virale, éjecté avec ses congénères de la cellule infectée et dont la machinerie génétique a été détournée pour les fabriquer.

# SOMMAIRE

---

Introduction générale	1
<b>CHAPITRE I : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
I.1. Historique	3
I.2. Définition et classification du VIH	3
I.3. Structure du virus	4
I.3.1. Aspect général	4
I.3.2. Le génome viral	5
I.3.3. La variabilité génétique du VIH	7
I.4. La multiplication du virus	9
I.4.1. Les étapes du cycle de réplication.	9
I.5. Epidémiologie mondiale	12
I.5.1. Situation du sida dans le monde	12
I.5.2. Situation en Algérie	13
I.5.3. Les modes de transmission	13
I.6. Les mécanismes immuns pathologiques de l'infection à VIH	14
I.7. Pouvoir pathologique du virus	15
I.7.1. Classification de l'infection	15
I.7.2. Histoire naturelle de l'infection par le VIH	16
I.8. Le diagnostic biologique de l'infection à VIH	17
I.8.1. Evolution des marqueurs virologiques (sérologiques)	18
I.8.2. Diagnostic biologique de l'infection à VIH	18
I.8.2.1. Diagnostic indirect	19
I.8.2.1. Diagnostic direct	22
I.8.2.3. Autres examens	23
I.8.2.4. Les algorithmes	23
I.9. Prévention	23
I.10. Traitement	24

# SOMMAIRE

---

## CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1. MATERIEL	26
II.1.1. Type d'étude	26
II.1.2. Population d'étude	26
II.1.3. Appareillage	26
II.1.4. Réactifs : les réactifs utilisés pour le dépistage	26
II.2. METHODES	27
II.2.1. Prélèvement	27
II.2.2. Les tests de diagnostic	29
A. MEIA	29
B. Test ELISA	32
C. Test de confirmation (WESTERN BLOT)	38
D. PCR en temps réel: Test COBAS ®AmpliPrep/ COBAS ® TaqMan ® HIV-1 Test, version 2.0 (Roche)	44

## CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Caractéristiques de la population	48
III.1.1. Selon le sexe et l'âge	48
III.1.2. Selon la région	49
III.1.3. Selon l'année	49
III.2. Résultats des tests	50
III.2.1. Test MEIA (AxSYM)	50
III.2.2. Test ELISA combiné	51
III.2.3. Test Western blot	51
III.2.4. Polymerase Chain reaction (PCR)	52
III.3. Discussion	55
CONCLUSION	59
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	

## **INDEX DES FIGURES**

---

<b>N°</b>	<b>Titres</b>	<b>Page</b>
<b>1</b>	Structure de VIH	<b>5</b>
<b>2</b>	Organisation du génome du virus VIH et expression des gènes	<b>6</b>
<b>3</b>	Classification phylogénique : les groupes du VIH-1	<b>8</b>
<b>4</b>	Classification phylogénique : les groupes du VIH-2	<b>9</b>
<b>5</b>	La voie de pénétration du VIH	<b>11</b>
<b>6</b>	Le cycle de réplication du VIH	<b>11</b>
<b>7</b>	Nombre d'adultes et d'enfants vivant avec le VIH en 2012	<b>12</b>
<b>8</b>	Les trois phases de l'infection à VIH	<b>16</b>
<b>9</b>	Les marqueurs virologiques au cours de la primo-infection par le VIH	<b>18</b>
<b>10</b>	Méthodologie de travail	<b>28</b>
<b>11</b>	Automate de sérologie	<b>30</b>
<b>12</b>	Principe du test de diagnostic MEIA	<b>31</b>
<b>13</b>	Spectrophotomètre SANOFI DIAGNOSTIC PASTEUR PR2100	<b>34</b>
<b>14</b>	Principe du test ELISA : HIV Ag/Ab combo ELISA 4.0 de MP diagnostic	<b>35</b>
<b>15</b>	Résultat de test ELISA	<b>38</b>
<b>16</b>	Principe du western blot	<b>40</b>
<b>17</b>	Résultat de test western blot	<b>44</b>
<b>18</b>	Automate de PCR en temps réel COBAS et l'amplificateur COBAS TaqMan 48	<b>45</b>
<b>19</b>	Principe de la PCR	<b>47</b>
<b>20</b>	Caractéristiques de population étudiées en fonction de l'âge et du sexe	<b>48</b>
<b>21</b>	Caractéristique des sujets étudiés selon la région	<b>49</b>
<b>22</b>	Caractéristique des sujets étudiés selon l'année	<b>50</b>

## **INDEX DES FIGURES**

---

<b>23</b>	Résultat du test MEIA	<b>50</b>
<b>24</b>	Résultat du test ELISA	<b>51</b>
<b>25</b>	Résultat du test western blot	<b>51</b>
<b>26</b>	Résultat WB du cas particulier	<b>52</b>
<b>27</b>	Résultat de la PCR	<b>52</b>
<b>28</b>	Centrifugeuse Jouan E82s	<b>Annexe 1</b>
<b>29</b>	Agitateur HEIDOLHPOLYAX 1040	<b>Annexe 1</b>
<b>30</b>	Micropipette à volume fixe de 50µl, 100 µl, 200 µl	<b>Annexe 1</b>
<b>31</b>	Embouts à usage unique (bleus et jaunes)	<b>Annexe 1</b>
<b>32</b>	Filtre membranaire (0,45 µm)	<b>Annexe 1</b>
<b>33</b>	Eprouvette	<b>Annexe 1</b>
<b>34</b>	Laveur manuel à vide millipores	<b>Annexe 1</b>
<b>35</b>	Incubateur à sec IPs	<b>Annexe 1</b>
<b>36</b>	Laveur automatique PW40	<b>Annexe 1</b>
<b>37</b>	Agitateur EV-102 tehtnica	<b>Annexe 1</b>
<b>38</b>	Amplificateur COBAS TaqMan 48	<b>Annexe 1</b>
<b>39</b>	Trousse de test ELISA	<b>Annexe 1</b>
<b>40</b>	Trousse de test western blot	<b>Annexe 1</b>
<b>41</b>	Trousse de test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 test, version 2.0 (PCR)	<b>Annexe 1</b>

## **INDEX DES TABLEAUX**

---

<b>N°</b>	<b>Titres</b>	<b>Page</b>
<b>I</b>	Gènes et protéines du VIH	<b>7</b>
<b>II</b>	Système de classification de l'infection VIH selon le CDC	<b>16</b>
<b>III</b>	Interprétation des résultats de WB selon les critères de l'OMS	<b>21</b>
<b>IV</b>	Aspect des constituants viraux en western blot	<b>43</b>
<b>V</b>	Caractéristiques de la population selon l'âge et du sexe	<b>48</b>
<b>VI</b>	Caractéristiques de la population selon la région	<b>49</b>
<b>VII</b>	Répartition de la population étudiée selon l'année	<b>49</b>
<b>VIII</b>	Résultat du western blot	<b>51</b>
<b>IX</b>	Résultats des tests MEIA, ELISA, WB et PCR	<b>53</b>
<b>X</b>	Composants de la trousse « Western blot »	<b>Annexe 2</b>
<b>XI</b>	Composants de la trousse « Elisa »	<b>Annexe 2</b>
<b>XII</b>	Composants de la trousse « AxSYM »	<b>Annexe 2</b>
<b>XIII</b>	Composants du kit « COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 »	<b>Annexe 2</b>

## INTRODUCTION GENERALE

---

Le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) appartient à la famille des *Retroviridae*, genre *Lentivirus*, il est responsable d'une infection chronique caractérisée par un ensemble d'infections opportunistes et /ou atteintes malignes, cet ensemble de syndromes est appelé SIDA (Syndrome d'Immuno Déficience Acquise) révélé en 1981. Comme son nom l'indique, il entraîne une dépression du système immunitaire ; car il s'attaque principalement aux lymphocytes TCD4+, aux monocytes et aux macrophages qui sont des cellules de la défense immunitaire (Irwin et al., 2000).

Le VIH est responsable actuellement d'une pandémie, avec 35 millions de personnes infectées dans le monde. Cette infection n'a épargné aucun pays, l'Afrique subsaharienne représente la région la plus touchée avec près de 25 millions de cas (environs trois quarts de l'ensemble des cas) (ONUSIDA, 2013). Les relations sexuelles constituent le mode de transmission le plus important.

Le diagnostic biologique de l'infection VIH est essentiellement sérologique, il consiste à rechercher les anticorps anti VIH1/2 et/ou les antigènes viraux (la protéine p24) par des techniques immunoenzymatiques ou autres. Les techniques de biologie moléculaire visant l'ARN ou l'ADN viral sont utilisées pour le diagnostic de l'infection chez les nourrissons de moins de 18 mois, et pour le suivi thérapeutique des malades.

L'évolution des techniques sérologiques a grandement amélioré les conditions de dépistage des infections à VIH. Parmi toute la variété de tests existant sur le marché, le western blot demeure la technique de référence permettant la confirmation d'une infection VIH. Malheureusement, les profils indéterminés obtenus par cette technique deviennent de plus en plus fréquents, qui peut donc compliquer le diagnostic de l'infection VIH et prolonger ainsi le délai du résultat. Pour cela, d'autres tests sont nécessaires pour palier à ce problème.

## INTRODUCTION GENERALE

---

L'ARN viral plasmatique est le meilleur marqueur biologique permettant de confirmer l'existence d'une réplication virale et donc de diagnostiquer une infection à VIH. Ce paramètre, ne fait pas partie de l'algorithme classique de diagnostic, à cause de son coût élevé et surtout l'exigence d'une qualification technique et d'un laboratoire bien équipé.

Le bût essentiel de notre travail, consiste à étudier l'interprétation des profils indéterminés obtenus par le Western Blot, en le comparant à d'autres tests sérologiques dont l'AxSYM, ELISA et par la recherche directe de l'ARN par la biologie moléculaire dont la PCR en temps réel, pour confirmer la présence ou l'absence d'une infection à VIH.

## I.1.HISTORIQUE

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est l'agent étiologique responsable de l'infection chronique de l'organisme humain appelé : SIDA (Syndrome d'Immuno Déficience Acquise) (**Barre-Sinoussi et Chermann, 1983**). Cette nouvelle maladie infectieuse est reconnue en 1981 pour la première fois aux Etats-Unis chez des jeunes homosexuels américains qui avaient manifesté une pneumonie à *Pneumocystis carinii* et le sarcome de kaposi, corrélés à un déficit immunitaire profond lié à la disparition des lymphocytes TCD4(LTCD4) (**Sanhadji, 1994 ; Kernbaum, 1990**).

L'origine virale du syndrome est découverte par LUC Montagnier à l'institut Pasteur de Paris, en 1983 (**Janier, 2009**).

Ce virus sera, successivement, dénommé LAV (lymphadenopathy associated virus), HTLVIII (Human T Lymphotropic Virus) et finalement HIV (Human Immunodeficiency Virus) ou VIH (Virus d'Immunodéficience Humaine) (**Hoang, 1989 ; Gallo, 1987 ; Charlemagne, 1989**).

En 1986, un second virus appelé VIH2, a été isolé chez les patients atteints du SIDA habitants dans les régions Ouest de l'Afrique (**Clavel et Guetard, 1986**).

En 1987, l'AZT ou Zidovudine est le premier médicament antirétroviral disponible (**Vaubourdoulle, 2007**).

## I.2. DEFINITION ET CLASSIFICATION

Le VIH appartient à la famille des *Retroviridae* (**Coffin, 1992 ; Levy, 1998**). Sous-famille des *Orthoretrovirinae* et au genre *Lentivirus* (**Izopet et al., 2007**).

Ces virus sont très largement répandus parmi les diverses espèces animales et sont définis essentiellement par leur mode de réplication. Le génome de ces virus, constitué de deux copies d'ARN simple brin de polarité positive, de haut poids moléculaire (environ 10KB), est en effet transcrit en un ADN bicaténaire grâce à une enzyme contenue dans le virion et caractéristique de cette famille : la transcriptase inverse (TI) ou reverse transcriptase (RT), rétro- transcrivant leur génome en ADN viral qui va s'intégrer dans l'ADN cellulaire de la cellule hôte (**Girard, 2011 ; Duriez, 2011 ; Sala, 1999**).

Le résultat direct de l'infection à VIH est d'infecter massivement et, quasi exclusivement, le système immunitaire amenant au syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) (Katlama, 2004 ; Lydyard, 2002).

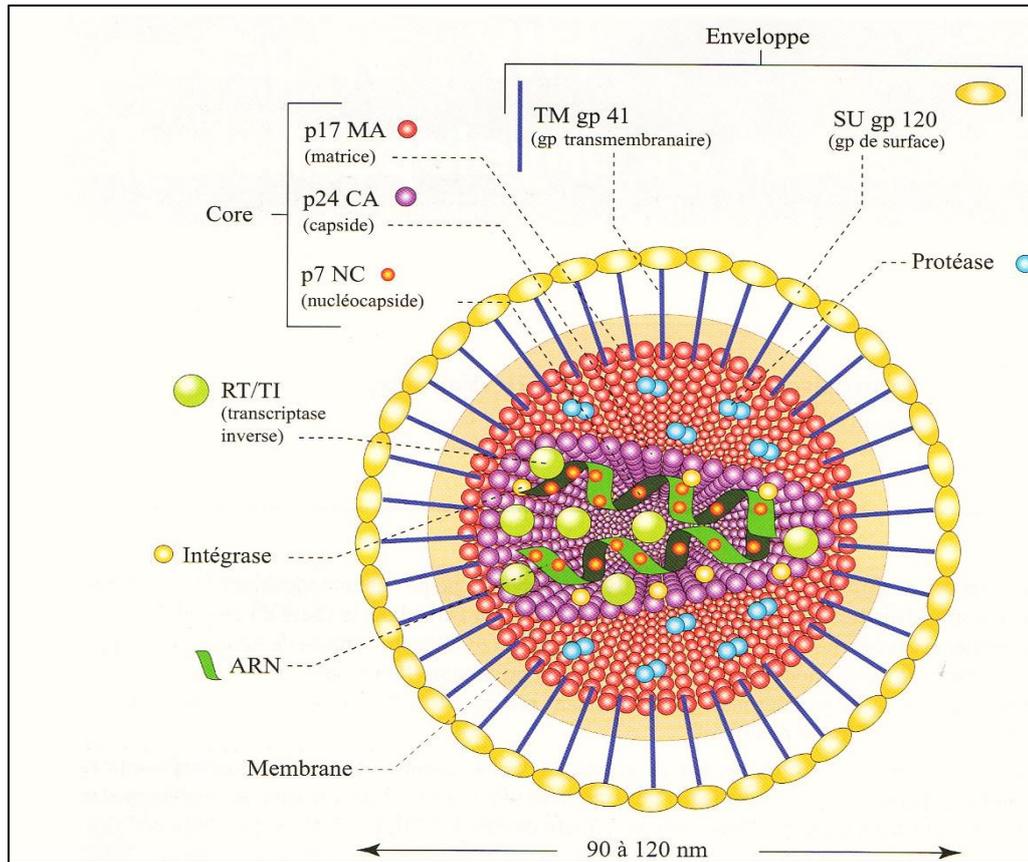
### I.3. LA STRUCTURE DU VIRUS

#### I.3.1.Aspect général

Le VIH se présente, schématiquement, sous la forme de particule sphérique de 90 à 120 nanomètres de diamètre (Duriez, 2011).

On retrouve, de l'extérieur vers l'intérieur (**figure 1**) :

- **L'enveloppe** : formée d'une double couche lipidique dérivée de la membrane cellulaire de la cellule précédemment infectée, elle contient deux glycoprotéines associées : gp 120 extramembranaire et gp 41 transmembranaire (Revillard, 2001).
- **La matrice** : l'intérieur de la particule virale est tapissé de molécules : protéine de la matrice (P17), et la protéase virale (Rozenbaum, 2001).
- **La capsid** : elle se présente sous une forme de trapèze au centre de la particule virale, constituée de protéine (p24). A l'intérieure de la capsid virale, on retrouve : les protéines de la nucléocapsid (p7), les enzymes nécessaires à la réplication du virus (la transcriptase inverse et l'intégrase) et le matériel génétique du virus constitué de deux molécules d'ARN identiques (Rozenbaum, 2001 ; Duriez, 2011).



**Figure 1: Structure du VIH (Huraux, 2003).**

### I.3.2. Le génome viral

Le génome du VIH (**figure 2**) est constitué de deux molécules d'ARN identiques avec une longueur d'environ 9200 nucléotides, il contient, comme tous les rétrovirus, 3 gènes rétroviraux classiques : gag, pol, env qui codent respectivement pour les protéines internes du virion, les enzymes nécessaires à la réplication virale et les protéines de surface du virus, de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' (**Goff, 2007 ; Rozenbaum, 2001**).

Il existe aussi six gènes viraux supplémentaires (**tableau I**), dénommés : **tat**, **rev**, **vif**, **vpr**, **vpu** et **nef**. Les protéines codées par ces gènes sont impliquées dans des phénomènes de régulation de l'expression des protéines virales et de la multiplication du virus (**Gordon et al., 2005 ; Seelamgri et al., 2004**). A chaque extrémité du génome, existe des régions répétitives LTR (Long Terminal Repeat), et des régions appelées : U5 et U3 (**Barin, 2002**).

L'organisation des VIH1 et VIH2 est similaire sauf que le gène **vpu** au sein du génome du VIH2 est remplacé par **vpx** (**Barre-Sinoussi, 2004**).

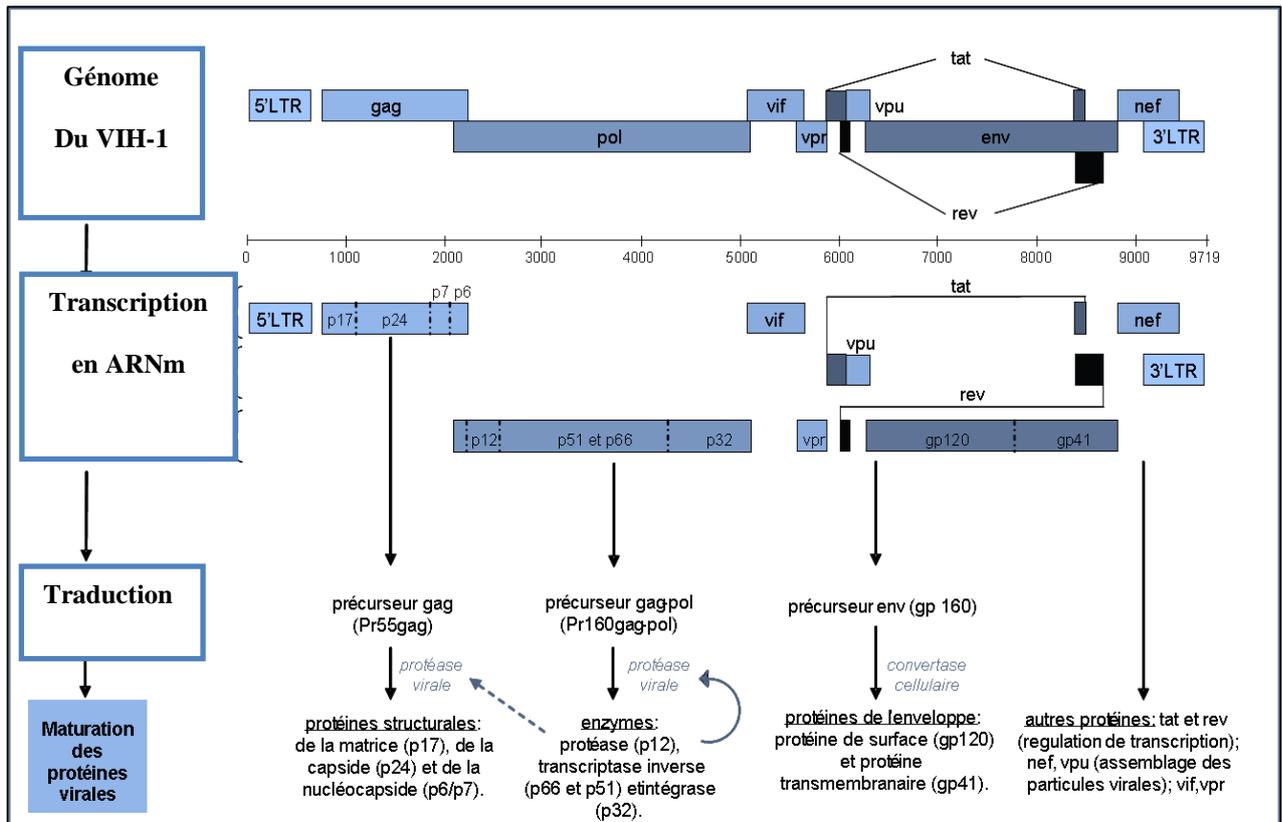


Figure 2 : Organisation du génome du virus VIH et expression des gènes (Korber et al., 1998 ; Nielsen et al., 2005)

**Tableau I : Gènes et protéines du VIH**

Gènes		Protéines codées	Fonctions
<b>Gènes communs aux rétrovirus</b>	gag	p17, p24, p7, p55	Protéines de structures
	pol	p66, p51, p31, p12	Protéase, reverse transcriptase, endonucléase
	env	gp 120 gp 41	Fixation au récepteur CD4 phénomène de fixation des membranes Fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire
<b>Gènes auxiliaires propre aux HIV (gènes de régulation)</b>	tat	Trans-activator	Augmente le niveau d'expression de tous les gènes viraux
	rev	Régulateur de l'expression des virions	Accumule ou transporte les ARNm des protéines de structure
	nef	Négative factor	Régulation négative
	vpr	Viral protéine R	Augmente la vitesse de Réplication
	vpu (VIH-1)	Viral protéine U	Maturation des virions
	vpx (VIH-2)	Viral protéine X	Mal connu
	vif	Virion infectivity factor	Rôle dans l'affectivité
	vpt	Viral protéine T	Cadre de lecteur ouvert Tat et protéine fusion à rôle inconnu
	tev	Tat env rev fusion protéine	Protéine hybride de 3exons ayant une activité tat et rev réduite

(Setffy et Wong Staal, 1991)

### I.3.3. La variabilité génétique du VIH

Le VIH est caractérisé par une grande variabilité génétique, liée aux nombreuses erreurs qui ont lieu au cours de la réplication, le taux de ces mutations est estimé à 1 pour 10 000 virus produits (Katlama, 2004).

Les variations génétiques entre les deux types de VIH, sont prédominantes dans certaines régions du génome viral tel que le gène env. C'est tout particulièrement le cas du domaine V3 de l'enveloppe du VIH1, qui possède d'importantes fonctions biologiques et immunologiques (Mc-Cutchan, 2006).

Il existe au moins deux types distincts de virus responsable de sida : VIH1 et VIH2.

- **VIH1** : il comprend trois groupes de virus qui sont (figure 3):

- ❖ **Le groupe M** : (pour majoritaire), le plus répandu dans le monde, découvert en 1983 (Barre-Sinoussi, 1983).

Il regroupe jusqu'à présent 9 sous- types (A-D, F-H, J-K) et des formes recombinantes appelées CRF (Circulating Recombinant Forms) (Mc-Cutchan, 2006).

- ❖ **Le groupe O** : (pour outlier) identifié essentiellement au Cameroun et au Gabon, il est beaucoup plus rare, découvert en 1990 (De Leys, 1990).

- ❖ **Le groupe N** : (pour new) identifié au Cameroun, en 1998 (Simon, 1989).

- ❖ **Le groupe P** : très proche de virus de gorille SIV gor, identifié en 2009 chez une femme Camerounaise (Duffy, 2009 ; Pantier et al., 2009).

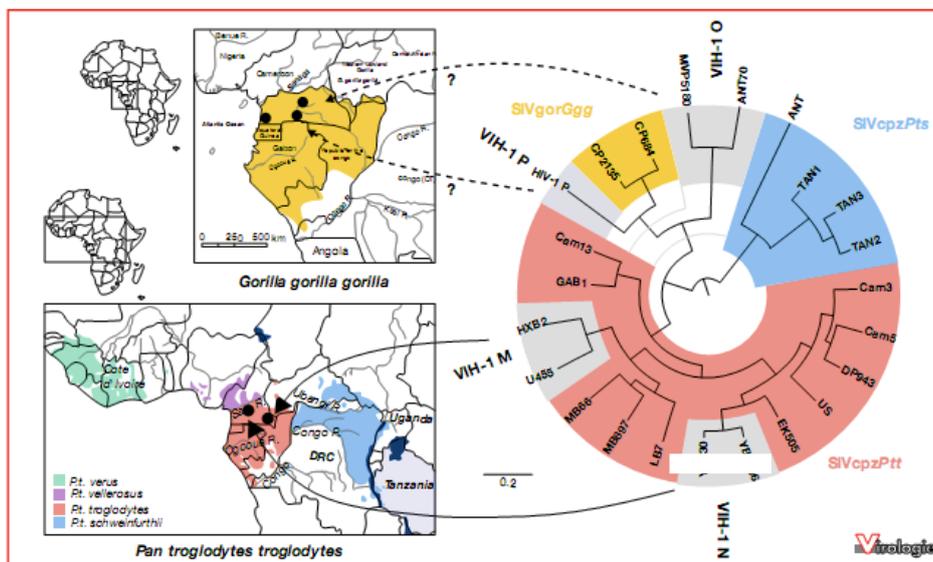


Figure 3 : Classification phylogénétique : les groupes du VIH-1 (Van Heuverswyn, 2007)

- **VIH2** : sa structure est similaire (figure 4), seuls quelques variations sont observés au niveau du poids moléculaire des protéines ainsi que les enzymes constitutives de ce virus

(Huraux *et al.*, 2003). Il comporte 6 sous-types de A à H, les plus fréquents étant les sous-types A et B (Genetet, 2002).

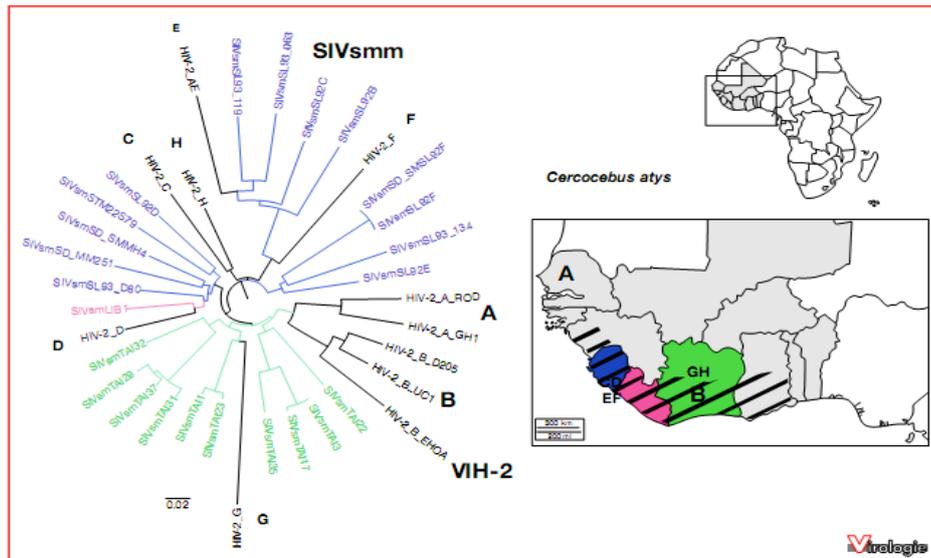


Figure 4: Classification phylogénétique : les groupes du VIH-2 (Lebreton, 2007)

## I.4. LA MULTIPLICATION DU VIRUS

### I.4.1 Les étapes du cycle de répliation et sa régulation

Les principales étapes du cycle du VIH sont communes à tous les rétrovirus (Barre-Sinoussi, 1996 ; Roth *et al.*, 1996). Chacune de ces étapes constitue une cible potentielle pour une thérapie antirétrovirale (Nielsen *et al.*, 2005).

- ❖ La répliation du VIH dans l'organisme a lieu dans de nombreux tissus (ganglions lymphatiques, intestin, thymus, cerveau, etc..) et/ou liquides biologiques (sang, liquide broncho alvéolaire, etc..), dans lesquels on retrouve les cellules cibles du VIH (Archel, 2009 ; Kayser, 2008).

Les principales étapes du cycle de répliation du VIH sont les suivantes (Figure 6):

- ❖ **L'adsorption et la pénétration:** l'entrée du virus dans la cellule commence par la liaison de la gp120 à son récepteur spécifique, la molécule CD4. Ce récepteur possède une forte affinité pour la partie C terminale de la gp120 du virus. Cette liaison engendre

un changement conformationnel de la gp120 permettant ainsi à la boucle V3 (une région spécifique de cette protéine), de se fixer à des corécepteurs à la surface de la membrane cellulaire (**figure 5**).

Parmi les corécepteurs du VIH, on distingue le CCR5 et CXCR4, dont le rôle est de reconnaître les chimiokines sécrétées par la cellule. Cette interaction entre gp120 et corécepteurs met en contact la gp41, avec la membrane cellulaire ; il en résulte une fusion entre l'enveloppe virale et la membrane de la cellule hôte et prélude à la pénétration du core dans le cytoplasme de la cellule (**Tilton, 2010**).

❖ **La rétrotranscription** : une fois entré dans la cellule, l'ARN viral va être immédiatement rétrotranscrit dans le cytoplasme en ADN par la RT. Celle-ci dégrade l'ARN viral puis copie l'ADN viral monocaténaire en ADN à double brin.

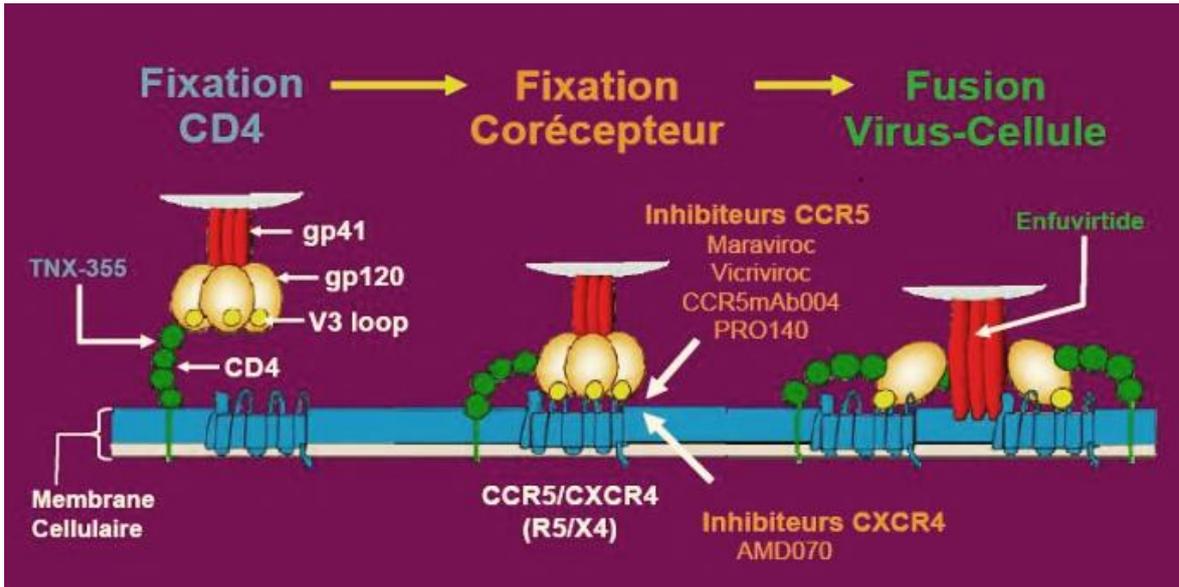
❖ **L'intégration** : grâce à l'intégrase virale, l'ADN chromosomique est clivé et l'ADN viral bordé par les séquences LTR s'intègre dans cet ADN chromosomique au sein du noyau de la cellule infectée, qui sera appelé ADN proviral (**Motomura et al., 2004**).

❖ **La transcription** : une fois intégré dans l'ADN cellulaire, l'ADN proviral est transcrit en ARN génomique et en ARN messagers grâce à une enzyme cellulaire l'ARN polymérase II.

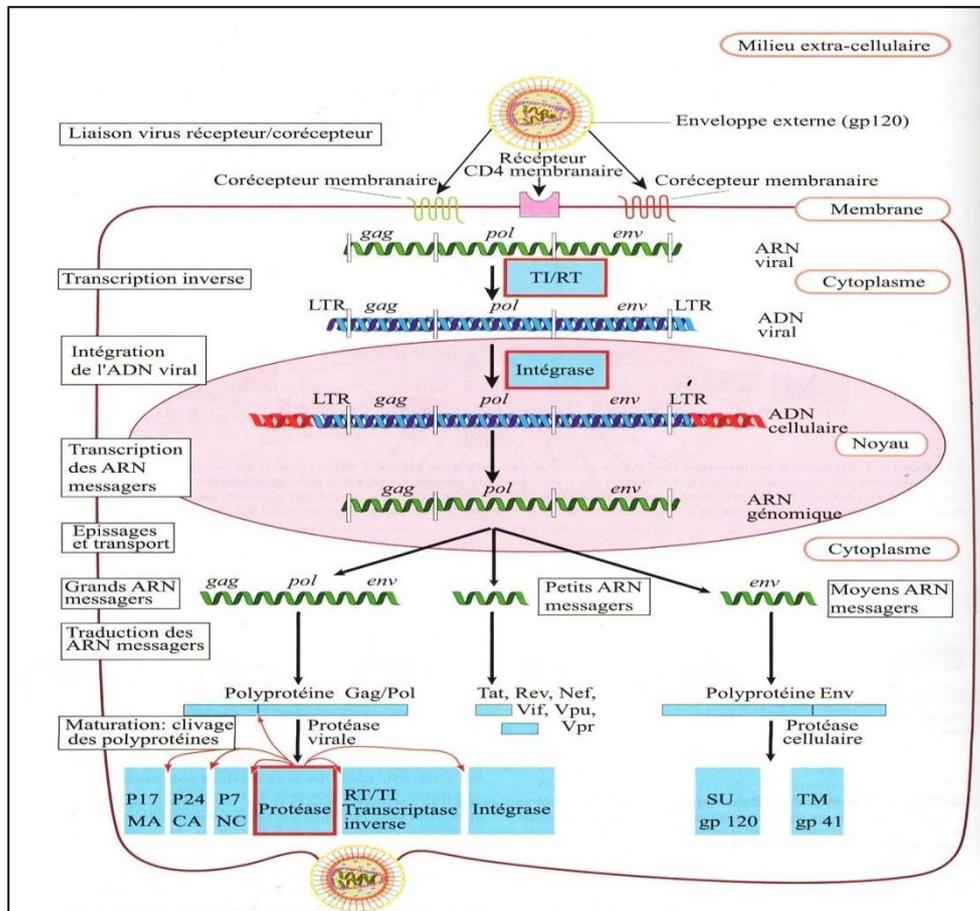
❖ **La traduction** : les ARNm subiront un épissage engendrant ainsi des ARN multi-épissés qui seront traduits en protéines virales régulatrices et aussi, en ARN peu ou non épissés qui seront traduits en polyprotéines virales de structure. Dans le cytoplasme de la cellule, ces polyprotéines qui sont des précurseurs non clivés, sont codées d'une part par les gènes gag et pol et d'autre part par le gène env. La polyprotéine Env va être clivée par une protéase cellulaire en deux protéines d'enveloppe (gp120 et gp 41).

❖ **L'assemblage** : les protéines virales Vpu et Vif interviennent dans l'assemblage des protéines virales et de deux molécules d'ARN virales au niveau de la membrane cellulaire. Cette dernière étape conduit à la formation de nouvelles particules virales, qui bourgeonnent à la surface de la cellule avant d'être libérées dans le milieu

extracellulaire, prêtes à infecter une nouvelle cellule cible (Barin, 2002 ; Brun-Vezinet *et al.*, 2003).



**Figure 5 : La voie de pénétration du VIH (Gastaut *et al.*, 2001).**



**Figure 6 : Le cycle de réplication du VIH (Huraux *et al.*, 2003).**

## I.5. EPIDEMIOLOGIE MONDIALE

### I.5.1 Situation du sida dans le monde

L'OMS estimait, en 1995, le nombre de personnes vivants avec le VIH/SIDA à 20 millions dans le monde (Semaille, 2011).

Depuis 2003, environ 3000 séropositivités VIH sont découvertes chaque année, chez des personnes ayant été contaminées par rapports sexuels, dont un tiers chez des homosexuels et deux tiers chez des hétérosexuels (Jinier, 2009).

En 2012, le nombre de personnes touchées est estimé à 35.3 millions. La plupart des personnes VIH positif vivent en Afrique (25 millions) (ONUSIDA, 2013).

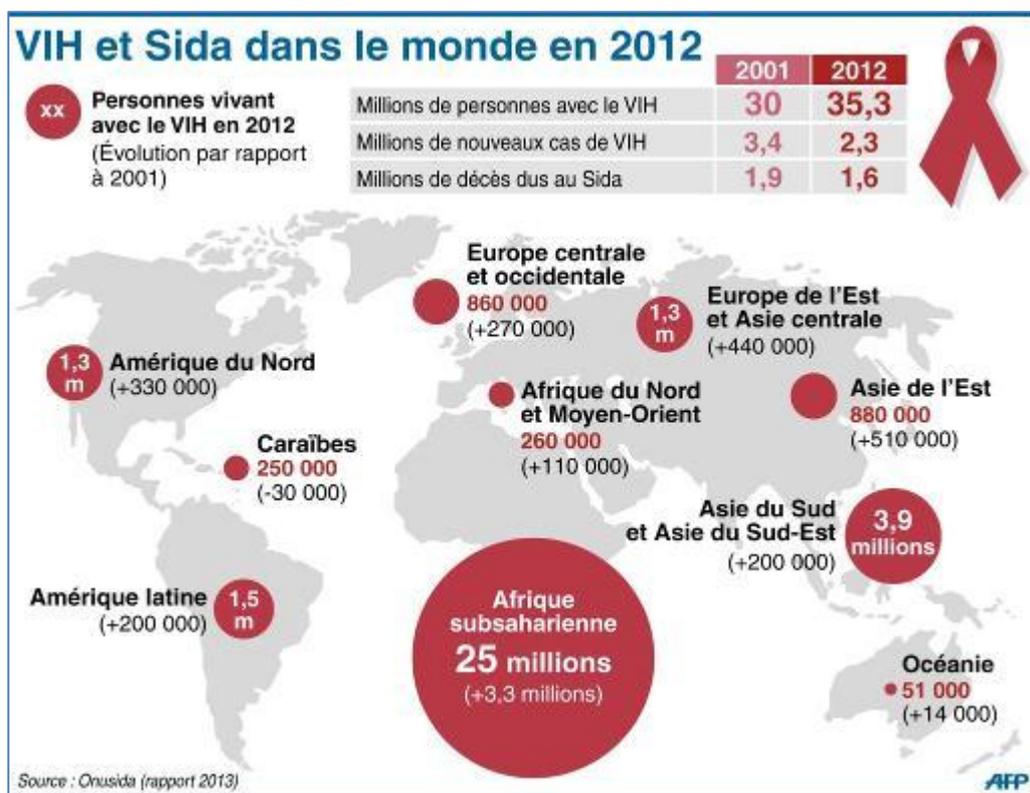


Figure 7: Nombre d'adultes et d'enfants vivant avec le VIH en 2012 (ONUSIDA, 2013).

### I.5.2 Situation du sida en Algérie

L'Algérie reste un pays à faible prévalence pour l'infection à VIH/SIDA. Selon le Laboratoire National de Référence de l'infection (LNR) VIH/SIDA, le nombre cumulé de personnes atteintes de VIH depuis l'apparition du premier cas en 1985 jusqu'au 31 Octobre 2013, est de **1448** cas de sida et de **6671** cas de personnes séropositives asymptomatiques. Depuis 1990, l'infection VIH est à déclaration obligatoire en Algérie. Les données de la notification par le LNR ne représentent pas la totalité des personnes infectées par le VIH ou atteintes du sida.

La situation épidémiologique de l'infection VIH en Algérie est caractérisée par :

Une augmentation régulière du nombre de cas : on assiste à une progression alarmante du nombre de nouveaux cas par an, surtout ces dernières années à raison de 600 à 700 cas approximativement.

### I.5.3 Les modes de transmission

Les trois principaux modes de contamination du VIH sont : la voie sexuelle, la voie sanguine et la transmission mère-enfant.

#### a) La transmission sexuelle

Elle est actuellement majoritaire (80% des cas). Le virus est présent dans le sperme et les sécrétions cervicovaginales. Certains types de rapports sexuels présentent un risque accru (Izopet et al., 2007).

#### b) La transmission par le sang

- La toxicomanie par voie intraveineuse est à l'origine de la contamination sanguine la plus fréquente.
- La contamination professionnelle : principalement dans les établissements de soins connue par les accidents d'exposition au sang (AES) (Sanhadji, 1995).
- Chez les hémophiles et les transfusés : la contamination des hémophiles a été liée à l'utilisation de facteurs de coagulation et des produits extraits du sang.

### c) La transmission mère-enfant(TME).

Les mères séropositives non traitées peuvent contaminer leurs enfants. Cette contamination survient le plus souvent lors du dernier trimestre de la grossesse, par le passage transplacentaire du VIH ou pendant l'accouchement par exposition de l'enfant au sang ou aux sécrétions génitales de la mère. L'allaitement maternel est rarement une source de contamination (**Laporte et Lot, 2004**). La prévention de la transmission maternofoetale par l'administration de traitement antirétroviral pendant la grossesse a permis de limiter la transmission à moins de 1% (**Izopet et al., 2007**).

Certains liquides biologiques contiennent une faible quantité de virus sans pouvoir de contamination parmi-eux : la salive, les larmes, la sueur et l'urine (**Sanhadji, 1995**).

### I.6. Les mécanismes immuns pathologiques de l'infection à VIH

Le VIH infecte les LTCD4 et les CPA, cellules clés du système immunitaire, induisant un déficit profond de l'immunité cellulaire (**Chark, 2000**).

Dès le début de l'infection à VIH-1, le processus pathologique est initié dans les organes lymphoïdes de l'homme, qui constituent un réservoir important de virus. D'autres tissus tels que la rate, l'intestin et le thymus sont également touchés. Les virions localisés dans les centres germinatifs, sont piégés par les cellules folliculaires dendritiques et seront ainsi présentés et transmis aux cellules lymphoïdes ganglionnaires (CD4), dans lesquelles ils se répliqueraient. Il en résulte un déficit qualitatif et quantitatif des lymphocytes CD4 (**Prescott et al., 2003**).

Les cellules sensibles à l'infection VIH sont surtout celles qui expriment à leur surface le récepteur CD4 et l'un des corécepteurs. Il s'agit des lymphocytes TCD4+ (helper ou auxiliaires), mais aussi des monocytes /macrophages ou d'autres cellules présentatrices d'antigène telles que les cellules dendritiques, les cellules de Langerhans ou les cellules microgliales du cerveau (**Geijtenbeek et al., 2000**).

Les cellules infectées présentent des épitopes viraux par leurs molécules du CMH de classe I et déclenchent **une réponse immunitaire cytotoxique** contrôlée par LTCD4 (auxiliaire)

de type Th1, capables de produire de l'IL-2 et de l'IFN $\gamma$ . Ces lymphocytes amplifient de façon majeure les réponses cytotoxiques CTL (cytotoxic T lymphocyt) au VIH (**Batch, 2002 ; Theze et Debre, 2000**).

Une infection de la cellule Th2 après liaison avec les molécules du CMH de classe II conduit à l'**activation des cellules B** suivie de la production d'Ac anti-VIH (protéines d'enveloppe, matrice, enzymes virales, protéines de régulation) : **c'est la réponse immunitaire humorale (Carcelain et Autram, 2001)**. La cellule B produit d'abord des IgM puis après un "switch" intracellulaire, elle produit des IgG puis des IgA et ensuite les autres classes d'immunoglobulines. Il y a une prolifération de plasmocytes producteurs, c'est ce qui explique que la quantité des anticorps va en augmentant au fur et à mesure du déroulement de la réaction (**Connick et al., 2001**).

La diminution du nombre de cellules TCD4, au cours de l'infection par le VIH, est due à plusieurs phénomènes :

- ❖ La destruction directe des cellules infectées par le virus.
- ❖ Les cellules TCD4 infectées sont tuées par les lymphocytes TCD8 cytotoxiques, qui reconnaissent des peptides viraux.
- ❖ L'inactivation fonctionnelle des cellules ; phénomène d'anergie (paralyse cellulaire).
- ❖ Les cellules infectées sont sensibles à l'induction d'apoptose, qui est la mort cellulaire programmée.
- ❖ Les LTCD4 infectées peuvent former un syncytium avec LTCD4 normaux in vitro (**Revillard, 2001 ; Autoran et al., 1997**).

## I.7. Pouvoir pathologique du virus

### I.7.1. Classifications de l'infection

- La classification du CDC proposée en 1993 distingue 3 catégories : A, B et C. Ces catégories sont subdivisées en 3 sous-catégories (1, 2 et 3) selon la valeur des lymphocytes TCD4+ (**tableau II**).
- La classification clinique différencie 4 catégories : N (asymptomatique) ; A (symptomatique mineur) ; B (symptôme modérés) et C (symptômes sévères).

- La classification immunologique comporte 3 catégories : I (pas de déficit immunitaire) ; II (déficit modéré) et III (déficit sévère) (Vaubourdolle, 2007).

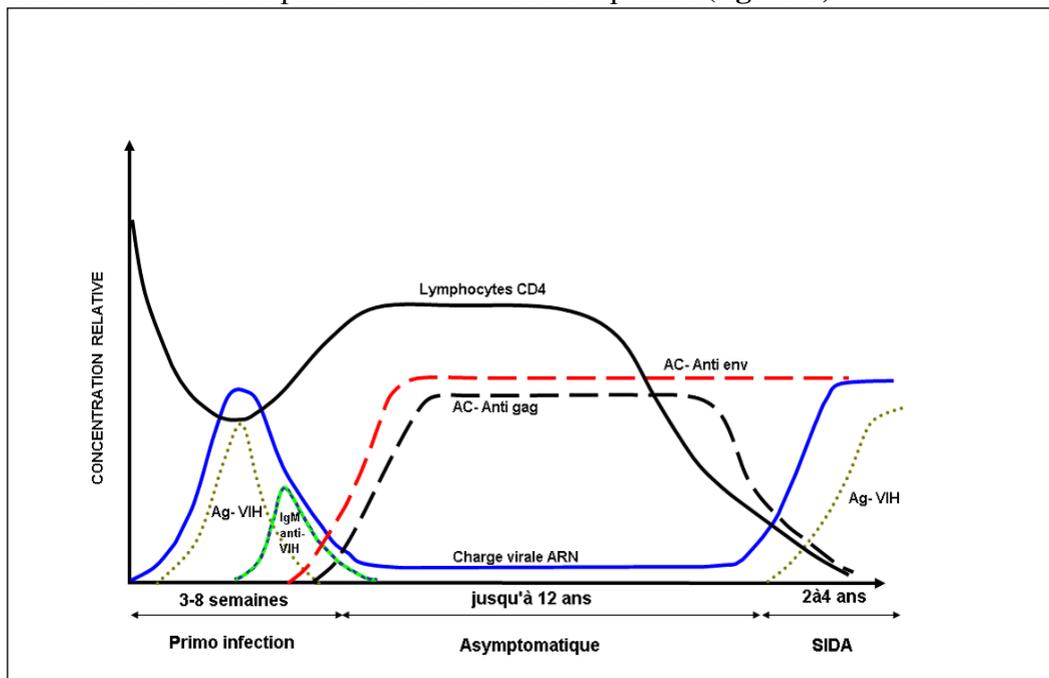
**Tableau II : Système de classification de l'infection VIH selon le CDC (1993)**

Nombre lymphocytes T CD4+	(A) Asymptomatique	(B) Symptomatique	(C) Sida
$\geq 500/\text{mm}^3$	A1	B1	C1
200 à $499/\text{mm}^3$	A2	B2	C2
$< 200/\text{mm}^3$	A3	B3	C3

(Duriez, 2011)

## I.7.2. Histoire naturelle de l'infection par le VIH

L'infection se caractérise par la succession de trois phases (figure 8) :



**Figure 8: Les trois phases de l'infection à VIH (Shanmugam et al., 2000).**

Chronologiquement, il semblerait qu'il y'ait d'abord une primo-infection pouvant être symptomatique caractérisée principalement par un syndrome mononucléosique, ainsi qu'une réaction fébrile, Perte de poids , éruption et une lymphadenopathie (**Laperche et al., 2000**).Durant cette phase les anticorps ne sont pas détectables dans les trois semaines qui suivent la primo-infection, l'ARN plasmatique est décelable en moyenne à partir du 10e jour (8 à 17 jours en moyenne) après la contamination, alors que l'antigène p24 ne se positive qu'en le 15<sup>e</sup> jour (12 à 26 jours).

Pendant la séroconversion, les premiers anticorps anti-VIH détectables sont dirigés contre la protéine p24. A ce stade, le Western Blot est souvent indéterminé (**Dercrion et al., 2005**).Une répllication très intense du virus est observée ; elle est en même temps contrôlée par le système immunitaire (SI). Puis une phase de latence clinique (asymptomatique) caractérisée par la présence persistance d'une faible virémie dans le sérum et par une déplétion graduelle des lymphocytes CD4. La constante baisse des CD4 et l'augmentation de la charge virale aboutissent en dernier à la phase appelée « phase symptomatique de l'infection » ou aussi « SIDA » (**Ivan et al., 2010**).

### I.8.Le diagnostic biologique du VIH

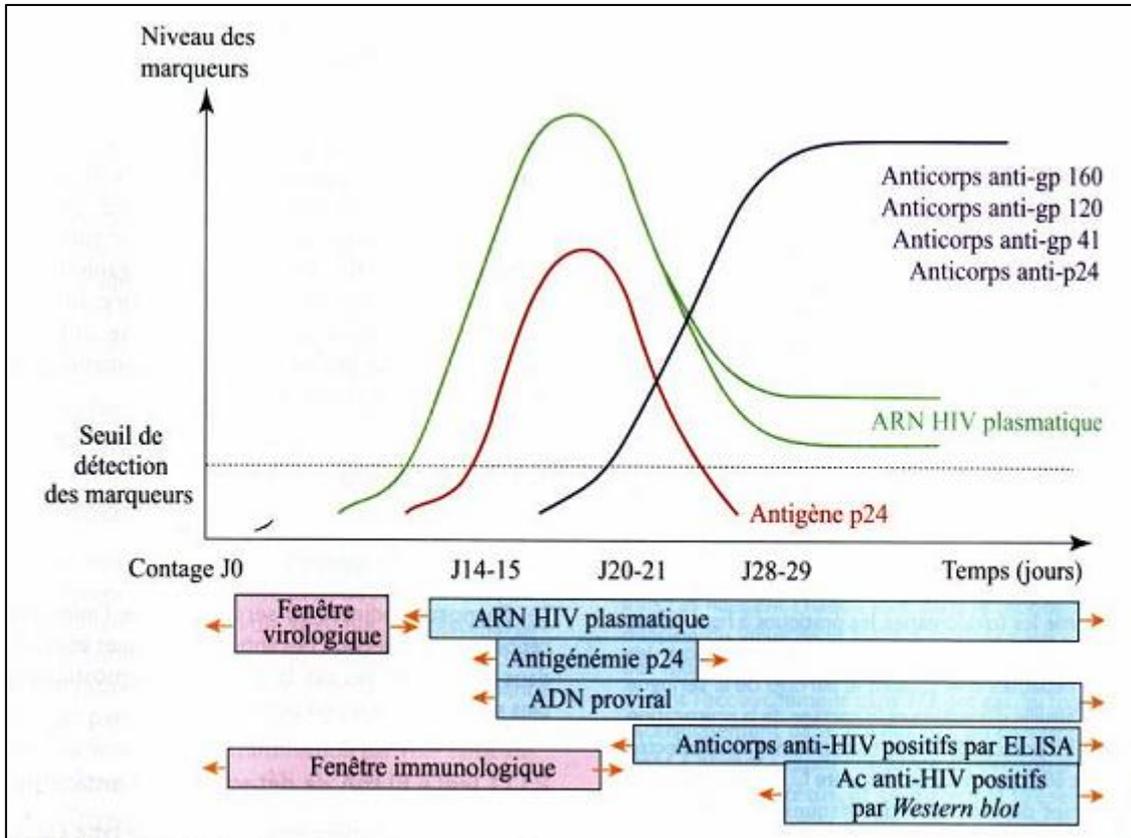
Le dépistage de l'infection concerne :

- ❖ Les personnes s'estimant ponctuellement ou durablement à risque de contamination.
- ❖ Les patients présentant des signes de primo-infection.
- ❖ Les personnes présentant des pathologies pouvant être des complications de l'infection à VIH.
- ❖ Le cas d'incarcération, en préopératoire, en pré-nuptial et lors de la déclaration de la grossesse.

Le dépistage VIH ne peut être prescrit sans l'accord du sujet.

## I.8.1. Evolution des marqueurs virologiques (sérologiques)

L'évolution des marqueurs au cours de l'infection par le VIH se fait selon la courbe de la figure ci-dessous.



**Figure 9 : Les marqueurs virologiques au cours de la primo-infection par le VIH (Révir, 2000).**

la cinétique des marqueurs virologiques montre que l'ARN plasmatique est détectable dès le 10<sup>e</sup> jour (8 à 17 jours en moyenne) après la contamination suivi de l'Ag p24 vers le 15<sup>e</sup> jour (12 à 26 jours) puis des anticorps anti VIH vers le 21<sup>e</sup> jour (20 à 45 jours), le sujet devient un séropositif : c'est la phase asymptomatique (Lepot et al., 2000).

## I.8.2. Diagnostic sérologique de l'infection à VIH

Il existe plusieurs types de tests VIH, les principaux utilisent la détection d'anticorps et/ou d'antigènes (protéines) ou encore une séquence d'ARN du VIH. En raison des limites inhérentes à tout test biologique, il est nécessaire de réaliser plusieurs tests (successivement un test sensible puis un spécifique) avant que le patient soit déclaré séropositif au VIH (Jacomet, 2001).

Le diagnostic sérologique comporte deux étapes : **le dépistage** puis **la confirmation**.

### I.2.8.1. Diagnostic indirect

Le diagnostic indirect cherche à mettre en évidence des anticorps synthétisés en réaction à une infection virale. Ces anticorps sont les marqueurs indirects de l'infection.

L'OMS oblige à pratiquer deux tests différents pour chaque sérum testé.

#### A. Les tests ELISA (Enzym Linked Immunosorbent Assay)

La technique d'ELISA a été conceptualisée et développée par 2 scientifiques suédois, **Peter Perlmann** et **Eva Engvall** à l'Université de Stockholm en **1971**.

C'est une technique immuno-enzymatique permettant la détection du complexe Ag/Ac après la fixation sur une phase solide telle que les puits d'une plaque multi-puits en plastique ou en billes (**Ly et al., 2000 ; Saville et al., 2001 ; Weber et al., 2000**).

#### Principe

Cette technique permet de visualiser une réaction Ag/Ac grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme (peroxydase du raifort ; la phosphatase alcaline, galactosidase) préalablement fixée à l'anticorps (**Laperche et al., 2000**).

Le changement de la coloration peut être constaté directement dans les plaques de réaction ou lu par photométrie optique (**Lambert et Latour, 2000**).

#### Les différentes modalités de la technique ELISA

- La méthode par compétition :

Elle est basée sur la différence d'affinité entre les anticorps anti-VIH1 marqués par une enzyme, et les anticorps du patient à se fixer sur des antigènes VIH-1 déposés sur la plaque de réaction. En cas de présence d'anticorps anti-VIH1 dans le sérum du patient, tous les sites antigéniques seront occupés par les anticorps du patient, l'anticorps marqué de plus faible affinité ne peut se fixer sur l'antigène (**Revillar, 2001**).

- La méthode sandwich :

Elle est utilisée pour un dosage d'anticorps et d'antigènes.

Dosage d'anticorps : les plaques sont recouvertes d'antigènes, puis on ajoute les anticorps à détecter et les antigènes marqués par une enzyme.

Dosage d'antigènes : les microplaques sont recouvertes d'anticorps, puis on ajoute les antigènes éventuellement présents dans le sérum, et les anticorps spécifiques couplés à une enzyme, et révéler par l'addition du substrat (**Goldsby et al., 2003**).

- La méthode combinée :

Elle est utilisée pour le dosage simultané d'anticorps anti-VIH et antigènes p24. Ces tests de diagnostic combinés permettent de détecter l'infection d'une façon précoce (**Herbein, 2003**).

### Evolution des tests ELISA

Depuis ,1985 les performances de ces tests n'ont cessé d'évaluer vers une grande sensibilité et spécificité, les premiers tests disponibles, appelés tests de **première génération** préparés à partir de lysats de cellules infectées, ils ont été remplacés par les tests dits **deuxième génération** utilisant des protéines recombinantes ou peptides de synthèse correspondant à une partie des principales protéines impliquées dans la réponse immunitaire .Les tests ELISA sandwich , appelés **de troisième génération**, sont plus récents , la révélation de la réaction antigène de la trousse avec les anticorps du patient ne se fait par une anti Ig-humaine , mais par un antigène marqué se fixant sur les sites anticorps restés libres.

Depuis quelques années (1998), ont été développés des tests ELISA **combiné**, appelés de **quatrième génération**, car détectant l'antigène p24, l'anticorps anti-VIH1 et VIH2 .Un résultat positif peut révéler la présence d'anticorps et/ou l'antigène (**Weber, 1998 ; Brun-Vezinet, 2000 ; Lacomet, 2000**).

### B. Autres tests

- Tests simples et rapides :

Ils sont basés sur le couplage d'antigènes viraux avec un support particulier tel que les particules de latex ou de gélatine, c'est une technique d'agglutination (**Mammette, 2002**), ou sur une filtration à travers une membrane recouverte d'antigène recombinants, c'est une technique de filtration par membrane (**Brun-Vezinet, 2000**) et en dernier, une technique immunochromatographique qui repose sur la détection qualitative des anti-VIH et la

migration de ces derniers sur des bandelettes contenant un conjugué avec qui ces Ac vont s'associer puis migrer afin de se lier aux Ag recombinants immobilisés (**Herbein, 2003**).

### C. Test de confirmation (WESTERN BLOT)

Ce test permet la détection des Ac anti-VIH sériques ou plasmatiques humains. Sa grande spécificité permet de confirmer ou affirmer les résultats trouvés positifs ou douteux en test de dépistage.

#### Principe

Ce test se présente sous forme de bandelettes de nitrocellulose sensibilisées par la présence de protéines antigéniques, une fois incubées avec le sérum du patient, la fixation des Ac sur les protéines spécifiques sera mise en évidence par un Ac conjugué à une enzyme et révélée par un substrat chromogénique (**Herbein, 2003**).

**Tableau III : Interprétation des résultats du WB selon les critères de l'OMS**

Diagnostic	Profil
Positif	Présence de deux Ac anti Env et d'un Ac anti Gag ou d'1 Ac anti Pol
Indéterminé	Présence d'un seul Ac anti Env et d'un Ac anti Gag ou d'Ac anti Pol Présence d'Ac anti Env seuls Présence d'Ac anti Gag et/ou anti Pol seuls
Négatif	Aucune bande ou bandes non répertoriées

(OMS)

Parmi tous les profils indéterminés, c'est la protéine p24 isolée qui est la plus fréquente.

L'interprétation « **indéterminé** » peut être liée à plusieurs éventualités :

➤ **l'infection VIH :**

- Un début de séroconversion (primo-infection) par le VIH, les anticorps anti VIH ne sont pas encore tous formés.
- Une positivité au VIH-2 (**Watt et al., 2000**) si le kit ne détecte que le VIH-1.
- Stade avancé du SIDA (déplétion progressive des Ac)
- Infection par d'autres *Retrovirus* comme le *HTLV* (réaction croisée)

➤ **Autres causes :**

- Hypergammaglobulinémie.
- Maladies auto-immunes, présence du complexe immunitaire circulant du facteur rhumatoïde (**Bocket, 2009**).
- Infections dues à d'autres agents pathogènes (**Basch et Sattern, 1997**).
- Grossesse (réactions non spécifiques) (**European aids clinical society et al., 2005**).

### I.8.2.2. Diagnostic direct

#### A. Technique d'amplification génique : PCR (Polymerase Chain Reaction)

Depuis son invention, la PCR est devenue la technique la plus utilisée pour la détection de l'ADN et de l'ARN. A partir d'une simple copie d'une séquence particulière d'acides nucléiques, cette séquence peut être spécifiquement amplifiée et détectée. Sa nature exponentielle rend cette technique attrayante pour des analyses quantitatives (**Houde et Poitras, 2002**).

#### Principe

Son principe repose sur l'extraction des acides nucléiques puis leur amplification par un ensemble de cycles, suivie d'une détection à l'aide d'une sonde spécifique (**Jacomet, 2001**).

#### B. Recherche d'antigène p24 :

S'effectue grâce au test ELISA ou l'anticorps anti-p24, fixé à la phase solide, va capter l'antigène libre du sérum.

Sa positivité doit toujours s'accompagner d'une recherche sérologique quelques semaines après.

#### C. Isolement viral :

Se fait par co-culture des lymphocytes du patient infecté avec les lymphocytes d'un donneur sain, dans un milieu de culture approprié. La multiplication virale sera mesurée par la détection et la quantification de l'antigène p24.

Ce test devient rare car il ne se pratique que dans les laboratoires de haute sécurité type P3.

### I.8.2.3. Autres examens

Un bilan biologique (population lymphocytaire, dépistage HCV, HBV, CMV...), une IDR à la tuberculine, une radiographie pulmonaire et un examen clinique complet permettant l'évaluation initiale de l'infection (**Izopet et al., 2007**).

### I.8.2.4. Les algorithmes :

L'algorithme d'analyse dit « conventionnel » utilise un test immuno-enzymatique pour le dépistage des échantillons et ceux trouvés positifs ou indéterminés sont ensuite confirmés par un test de confirmation qui est le Western-Blot.

L'algorithme d'analyse dit « alternatif » se base sur une combinaison de tests de dépistage sans Western-Blot. L'algorithme conventionnel a beaucoup d'inconvénients, à savoir : les résultats indéterminés donnés par le Blot ainsi que son coût élevé, l'exigence d'une qualification technique et d'un laboratoire bien équipé. Pour cette raison, l'OMS conseille maintenant le remplacement de l'algorithme conventionnel par l'algorithme alternatif à condition que le premier test soit très sensible ( $\geq 99\%$ ) et le second spécifique ( $\geq 98\%$ ) (**ONUSIDA / OMS, 1997**). Cette nouvelle stratégie a grandement amélioré les conditions de dépistage de l'infection à VIH dans les pays à ressources limitées puisqu'elle permet de donner la même qualité de résultats à moindre coût.

## I.9. Prévention

La prévention permet d'éviter la propagation de la transmission du VIH. Parmi ces moyens de prévention :

- a. **L'information et l'éducation sanitaire** : l'action de prévention intègre des informations claires et nettes sur les modalités de la contamination et la précaution à prendre face à ce risque (**Raffi, 1999**).
- b. **Mesures techniques** :
  - **La prévention de la transmission sanguine**
    - ❖ **Le matériel d'injection** : doit être réservé à une seule utilisation (matériel à usage unique) ou être correctement stérilisé, le VIH est parfaitement détruit par différents agents physique ou chimique, (alcool, eau de javel diluée, glutaraldéhyde, chauffage à 56 c □).
    - ❖ **Contrôle de sang et ses dérivés** : le dépistage obligatoire des dons de sang et d'organes avec un contrôle sérologique (VIH, VHC, VHB).

- **La prévention de la transmission sexuelle** : utilisation de préservatifs, peut être masculin ou féminin.
- **La prévention de la transmission mère-enfant** : le traitement par la zidovudine (AZT) en fin de grossesse, pendant l'accouchement et les 6 premières semaines de vie de l'enfant, permet de réduire de 25 % à 8 % le taux de transmission (**Amrane, 2000**).

### I.10 Traitement de l'infection à VIH

Le traitement actuel de l'infection à VIH repose sur **la chimiothérapie anti-rétroviral**, son but est de réduire la charge virale (donc la réplication du VIH) à un niveau très bas et de maintenir cette réduction le plus longtemps possible (**Revillard 2001, Fleury 2002**).

La charge virale et le nombre de lymphocytes CD4 sont les deux paramètres complémentaires et indispensables à l'instauration et à la surveillance d'un traitement antirétroviral (**Kaltma et al., 2004**).

**a. Les différentes classes thérapeutiques** : les antirétroviraux sont classés en fonction de leur mode d'action sur les virus.

- ❖ inhibiteurs de l'entrée du VIH dans la cellule :
  - Les inhibiteurs de fusion : capables de bloquer l'entrée du virus dans la cellule immunitaire CD4 par inhibition de la fusion VIH-membrane cellulaire (**Fleury, 2002**).
  - Les inhibiteurs de corécepteurs.
- ❖ Les inhibiteurs de la réplication (inhibiteurs de la transcriptase inverse) :
  - Les inhibiteurs nucléosidiques de la TI (INTI) : analogues aux nucléosides capables d'empêcher la réplication du virus en agissant sur la transcription inverse de la copie d'ARN viral en ADN, avant son intégration dans l'ADN cellulaire.
  - Les inhibiteurs non nucléosidiques de la TI (INNTI) : ils sont toujours donnés en association avec d'autres classes thérapeutiques vu le grand taux de résistance (**Genetet 2002 ; Fleury, 2002 ; Rouzenbaum, 2001**).

- Inhibiteurs de l'intégrase : ils sont censés bloquer l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte, (**Katlama et al., 2004**).
  - ❖ Les inhibiteurs de la maturation (inhibiteurs de la protéase) : la polyprotéine formée ne peut être clivée en protéines virales actives.
- b. Les schémas thérapeutiques recommandés :**
- ❖ 2 INTI + IP
  - ❖ 2 INTI + INNTI
  - ❖ 3 INTI (**Delfraissy, 2004 ; Bon, 2004**).
- c. Nouvelles perspectives thérapeutiques :**
- ❖ **La thérapie génique** : elle constitue une voie d'avenir, avec la mise au point de vecteur capable de rendre in vivo les cellules cibles de l'infection résistantes au virus.
  - ❖ **Le vaccin préventif** : c'est le développement d'un vaccin anti-VIH qui se heurte actuellement à plusieurs problèmes :
    - ✓ sa variabilité : grande capacité de mutation.
    - ✓ voies de pénétration multiples
    - ✓ l'existence de réservoirs de virus échappant à l'action des anticorps (**Revillard, 2001**).



### Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé à l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA) annexe Sidi Fredj, au Laboratoire National de Référence de l'infection à VIH (LNR).

#### II.1. Matériel

##### II.1.1. Type d'étude

C'est une étude descriptive d'ordre diagnostique concernant l'infection à VIH chez des sujets ayant un résultat positif au niveau d'un laboratoire externe, et dont le but est de confirmer l'infection.

Cette étude a été réalisée durant 7 mois allant de Mars jusqu'au Septembre 2013, au niveau du laboratoire VIH (LNR).

Les facteurs étudiés : la protéine p24, les anticorps anti VIH-1/2 et l'ARN VIH.

##### II.1.2. Population d'étude

Notre étude a porté sur des sérums préalablement congelés à  $-20\text{ C}^{\circ}$  jusqu'à la réalisation de notre étude, provenant de 60 sujets âgés entre 12 et 64 ans et recrutés durant une période qui s'étend de 2007 à 2013.

##### II.1.3. Appareillage

- Automate de sérologie **AxSYM ABBOTT**.
- Centrifugeuse **jouan E82s**.
- Agitateur **EV-102 tehcnica**.
- Agitateur **HEIDOLH POLYMAX 1040**.
- Incubateur à sec **IPs**.
- Laveur manuel à vide Millipore.
- Laveur automatique **PW 40**.
- Spectrophotomètre **SANOFI DIAGNOSTIC PASTEUR PR2100**avec imprimante.
- Automate **ROCHE**.

### II.1.4. Réactifs : les réactifs utilisés pour le dépistage (Annexes2).

- Trousse MP HIV Ag/Ac.
- Trousse MP western-blot HIV-1 BLOT 1.3.
- Trousse d'AxSYM HIV ½ gO.
- Trousse PCR COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0.

## II.2. Méthodes

### II.2.1. Prélèvement

Les 60 prélèvements de sérum, préalablement congelés, ont subi au préalable une série de deux tests ELISA et un test Western blot, avec des résultats discordants (ELISA 1 + / ELISA 2 - / présence isolée d'Ac anti P24 WB) ce qui nous a permis de les classer comme étant indéterminés. Ces sérums sont décongelés puis centrifugés (15 minutes, 4000 tours), ensuite une étape de microfiltration a été réalisée sur le surnageant.

La microfiltration se fait à l'aide du dispositif swinnex millipore, c'est une filtration sous pression avec un filtre membrane (0.45 µm).

Le dispositif est adapté sur une seringue remplie de sérum, en pressant sur le piston de la seringue, on éjecte le sérum dans les tubes.

Les étapes de la méthodologie de travail (**figure 10**):

(A) Nous avons 60 sérums qui sont déjà indéterminés : nous avons débuté avec le test MEIA car il représente une très grande sensibilité visant la moindre concentration d'anticorps anti p24 HIV-1 et 2. Cette sensibilité peut être augmentée en élargissant la surface de contact et en utilisant un conjugué marqué à la fluorescéine avec un système optique très sophistiqué qui utilise le rayonnement ultraviolet.

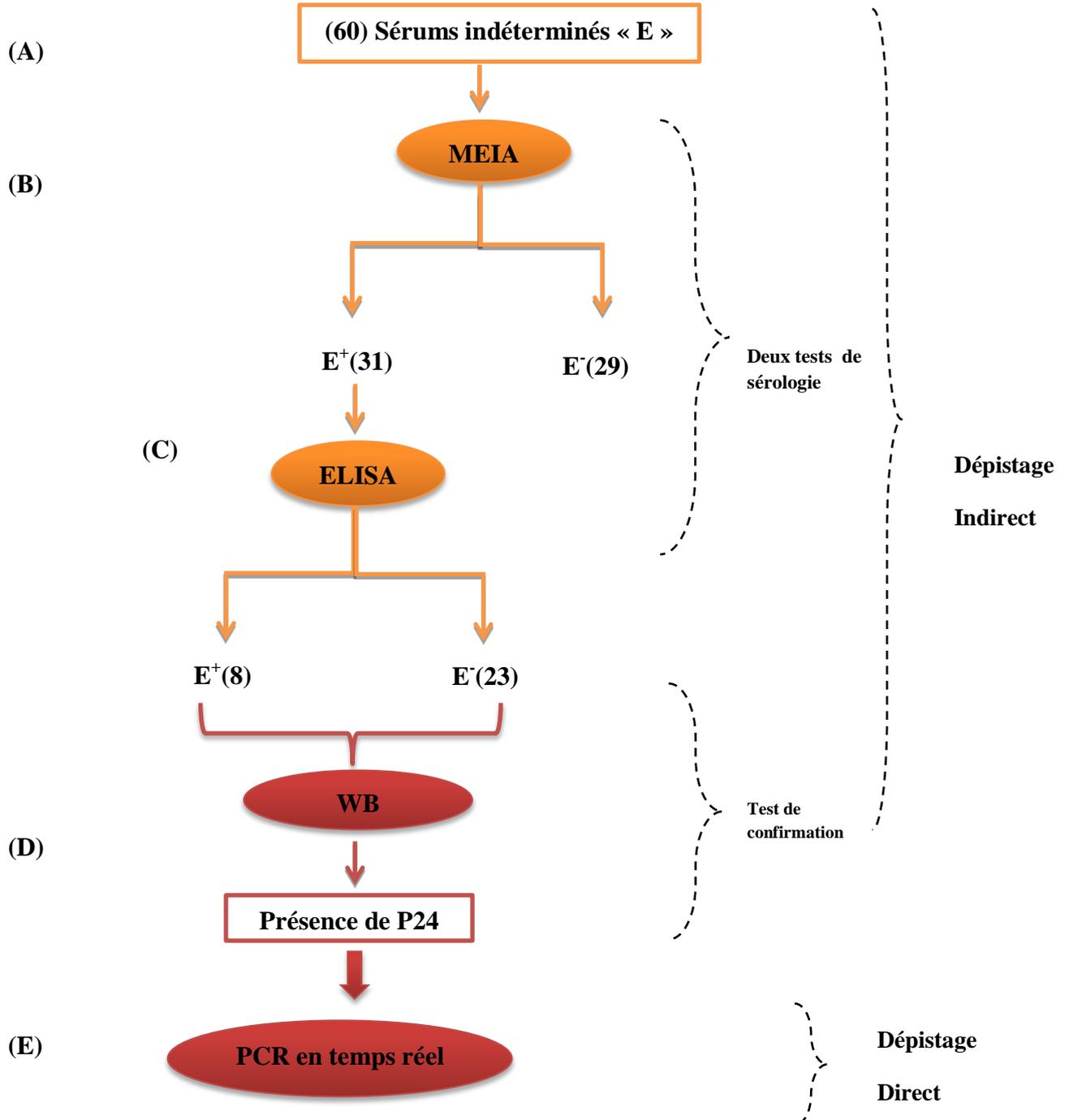
D'après **PAYAN et al. (2000)**, la méthode automatisée sur AxSYM ABBOTT permet de détecter en 20 minutes les anticorps dirigés contre les protéines structurales et non structurales, ce test permet une approche sérologique quantitative, calibrée sur le seuil de test.

(B) Nous avons analysé les 60 sérums par le 1<sup>er</sup> test AxSYM : nous avons obtenu comme résultats 31 échantillons positifs et 29 échantillons négatifs.

(C) Les 31 sérums positifs en AxSYM ont été analysés par un 2<sup>ème</sup> test qui est l'ELISA: nous avons obtenu 23 échantillons négatifs et 8 échantillons positifs.

(D) Aussi, les 31 sérums positifs en AXSYM ont été analysés par un 3<sup>ème</sup> test qui est un test de confirmation Western Blot.

(E) A la fin de notre travail, nous avons analysé les 31 sérums par PCR en temps réel à la recherche de l'ARN viral.



**Figure 10: Méthodologie de travail (Original)**

**II.2.2. Les tests de diagnostic****A. MEIA (Méthode immuno-enzymatique microparticulaire : AXSYM HIV<sup>1/2</sup> gO).****Définition**

C'est un dosage immunoenzymatique microparticulaire pour la détection qualitative des anticorps dirigés contre le virus VIH-1 et VIH-2 dans le sérum ou plasma humain. Il est utilisé dans le diagnostic d'une infection par le VIH.

**Principe**

L'échantillon et tous les réactifs **AxSYM VIH<sup>1/2</sup> gO** nécessaires pour une série de dosage, sont pipetés par l'aiguille d'échantillonnage dans des CR (cellule réaction).

La CR est immédiatement transférée dans l'unité de traitement où s'opère une série de réactions, dont le pipetage continue avec l'aiguille de traitement, les réactions ont lieu dans l'ordre suivant :

- ❖ Le diluant pour échantillon, l'échantillon et les microparticules recouvertes d'antigènes recombinants (enveloppe du VIH-1, core VIH-1 et enveloppe du VIH-2) sont ajoutés dans les puits à échantillon de la CR.
- ❖ Lorsque les anticorps humains anti-VIH-1/VIH-2 sont présents dans l'échantillon, ils se lient aux microparticules recouvertes pour former des complexes antigène-anticorps dans le mélange réactionnel.
- ❖ Une partie du mélange réactionnel est transférée sur la matrice. Les microparticules se lient irréversiblement sur la matrice en fibre de verre.
- ❖ La matrice est lavée afin d'éliminer tout matériel non lié aux microparticules.
- ❖ Des antigènes recombinants marqués à la biotine (enveloppe du VIH-1, core du VIH-1 et enveloppe du VIH-2) et des peptides synthétiques correspondant à l'enveloppe du VIH-1 et à l'enveloppe du VIH-2 sont distribués sur la matrice et forment un complexe antigène-anticorps-antigène.
- ❖ La matrice est lavée afin d'éliminer tout matériel non lié aux microparticules.
- ❖ **Le conjugué** d'anticorps anti-biotine : phosphatase alcaline est distribué sur la matrice et se lie aux complexes immuns (antigène-anticorps-antigène), puis la matrice est lavée.
- ❖ **Le substrat** : phosphate de méthyl-4-ombelliféryl, est ajouté. Le conjugué marqué à la phosphatase alcaline catalyse la séparation d'un groupement phosphate du substrat

conduisant à l'obtention d'un produit fluorescent le **méthyl-4-ombelléférone**. Ce produit est mesuré par le système optique MEIA.



**Figure 11 : Automate de sérologie AxSYM ABBOTT**

Les étapes de la réaction sont illustrées dans la figure 12.

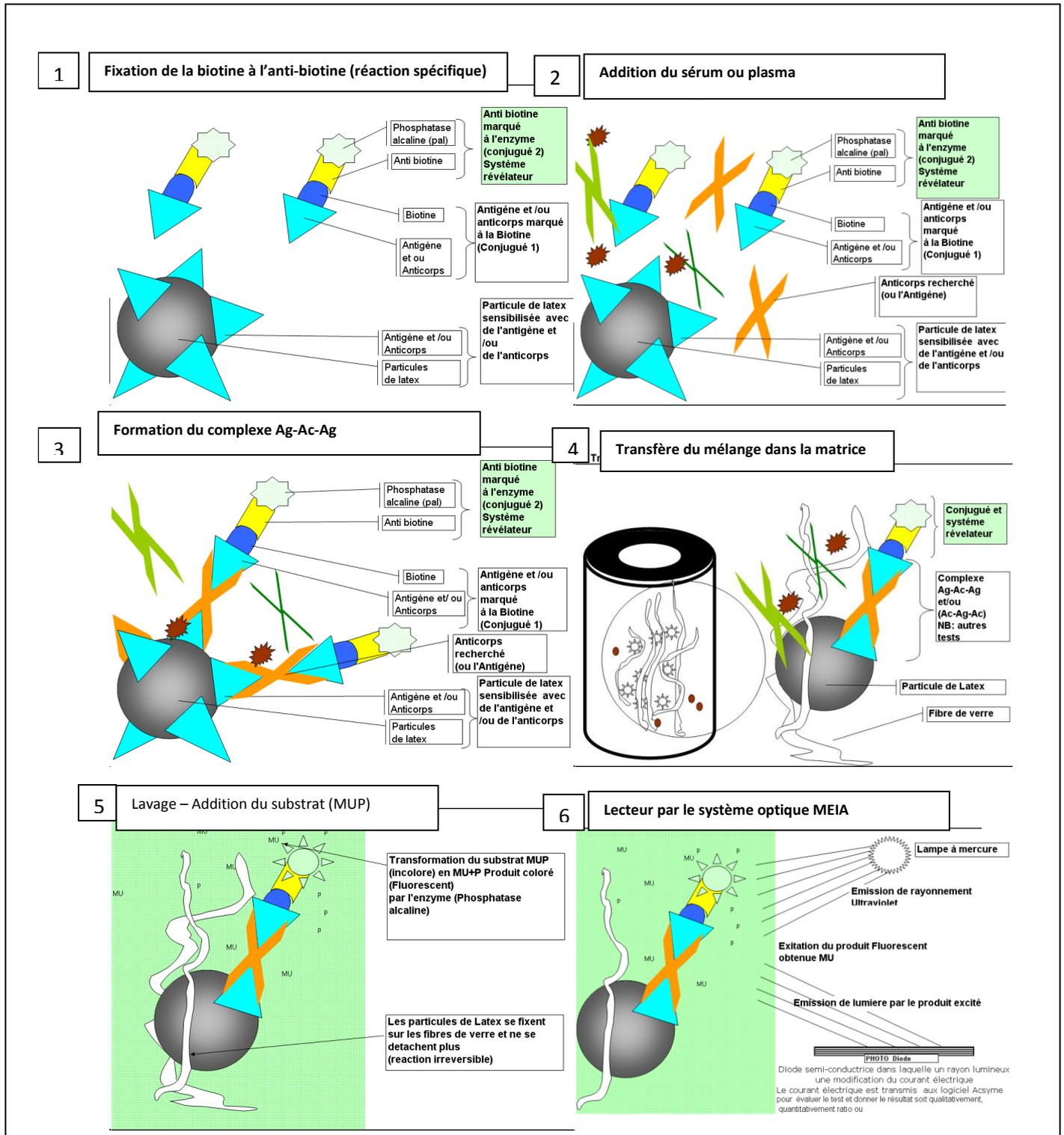


Figure 12: Principe du test de diagnostic MEIA (Lazzarotto *al.*, 2001)

### *Mode opératoire*

Les échantillons qui ont été congelés puis décongelés, doivent être transférés dans un tube pour être centrifugé. Après, ceux dont la quantité de sérum était insuffisante, ont été mis dans des godets-échantillons ou un tube aliquot pour l'analyse.

### *Interprétation des résultats*

La présence ou l'absence des anticorps dirigés contre le VIH dans l'échantillon est déterminée en comparant le taux du produit fluorescent à la valeur seuil calculée à partir d'une précédente calibration indice AxSYM. Si le taux de formation du produit fluorescent est supérieur ou égal à la valeur seuil, l'échantillon est considéré comme réactif pour l'anticorps anti-VIH.

La valeur seuil est déterminée en ajoutant 27.5 à la moyenne du calibrateur indice.

$$\text{La valeur seuil(CO)} = \text{valeur moyenne de calibrateur indice} + 27.5$$

Le dosage AxSYM VIH calcule un résultat basé sur le ratio de la valeur de l'échantillon sur la valeur seuil pour chaque échantillon.

S : le ratio de la valeur de l'échantillon

CO : la valeur seuil.

$$S / CO = \text{Echantillon/valeur seuil}$$

E : Echantillon.

- $S / CO \leq 1.00$  → considérés comme négatifs.
- $S / CO > 1.00$  → considérés comme réactifs.

### **B. Test ELISA : HIV Ag/Ab combo ELISA 4.0 de MP diagnostic**

#### *Définition*

C'est une technique immuno-enzymatique basée sur le principe du sandwich pour la détection et la quantification de l'Ag p24 et les différents Ac associés aux virus VIH-1/2, dans le sérum ou plasma humain.

### *Principe*

C'est une technique qui permet de visualiser une réaction Ag/Ac grâce à une réaction colorée produite par l'action de la peroxydase sur son substrat. L'ajout de ce substrat chromogène permet de mesurer l'intensité de la coloration qui est proportionnelle à la concentration initiale de l'antigène et/ou de l'anticorps, la lecture se fait par spectrophotomètre.

Le kit utilisé est basé sur le principe de l'ELISA sandwich permettant la détection de l'antigène p24 et des anticorps anti VIH1/2 (test combiné).

Ce kit ELISA est une incubation en deux étapes, « sandwich » immuno-enzymatique qui utilise des puits microplaque en polystyrène préenduit d'antigène recombinés VIH (VIH-1 gp 41 et la gp 120, VIH-2 gp 36) et des anticorps anti VIH (p24).

Dans un premier temps, anti-VIH anticorps p24 biotinylé avec l'échantillon de sérum ou plasma du patient sont ajoutés dans les puits. pendant l'incubation, les anticorps spécifiques VIH 1/2 si elle est présente dans l'échantillon seront capturés à l'intérieur du puits.

En même temps, si l'antigène p24 du VIH est présent dans l'échantillon, il sera également capturé comme un double anticorps « sandwich » complexe comprenant des anticorps p24 enduit et anticorps p24 biotinylés. Les cupules sont ensuite lavées pour éliminer les protéines sériques libres.

La détection de la p24 complexe antigène-anticorps biotinylé VIH 1/2 capturé ou anticorps anti VIH 1/2 est réalisée au cours de la seconde étape d'incubation en ajoutant de l'enzyme peroxydase de raifort (HRP) qui a été conjugué à deux antigène recombinés VIH et à l'avidine.

### **Détection p24 :**

Quand la p24 été capturé à l'intérieur du puits, l'avidine va réagir avec la biotine et l'attacher HRP au complexe Ac-p24-Ac.

### Le VIH 1/2 détection d'anticorps :

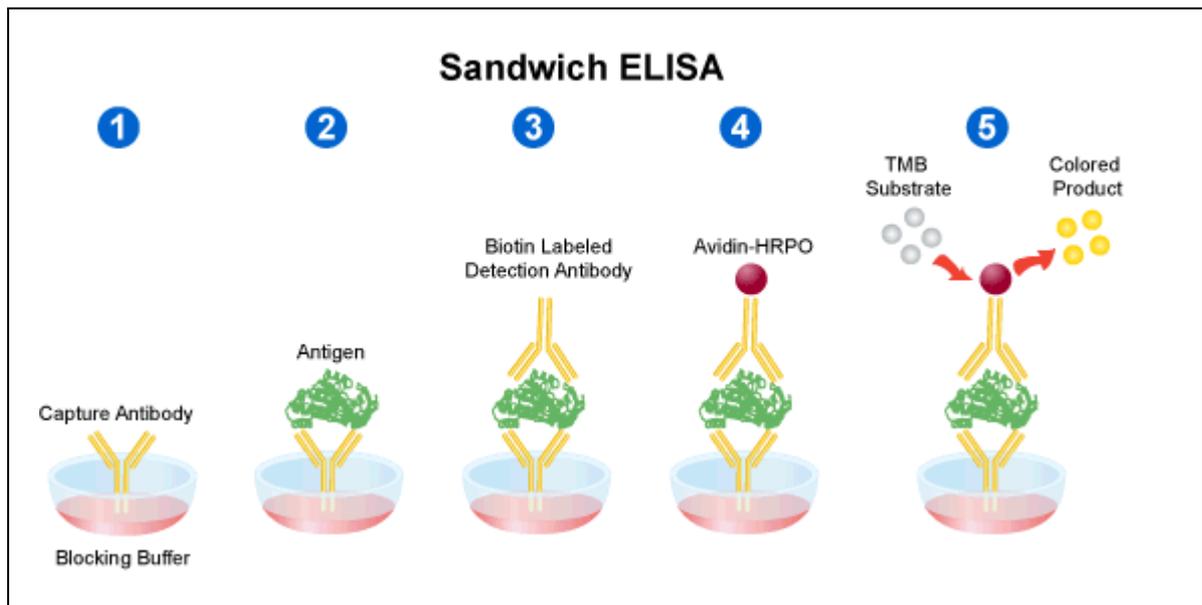
Quand les anticorps anti-VIH ont été capturés à l'intérieur du puits, les antigènes conjugué-HRP se lient aux anticorps capturés formant Ag-p24-Ag (HRP) de complexes immuns « sandwich ».

Les cupules sont lavées pour éliminer le conjugué non lié, et des solutions chromogène sont ajoutés aux puits.

Dans les puits contenant l'Ag-Ac-Ag (HRP) et / ou Ac-p24-Ac (HRP) des complexes immuns « sandwiches », les chromogènes incolores sont hydrolysées par la HRP lié à un produit de couleur bleu. La couleur bleu devient jaune après arrêt de la réaction avec de l'acide sulfurique .la quantité de l'intensité de la couleur peut être mesurée et est proportionnelle à la quantité d'anticorps ou d'Ag p24 dans le puits, et à l'échantillon, respectivement. Les puits contenant les échantillons négatifs pour anti-VIH 1/2 ou Ag p24 restent incolores. La lecture s'effectue au spectrophotomètre à 450/620nm



**Figure 13 : Spectrophotomètre SANOFI DIAGNOSTIC PASTEUR PR2100**



**Figure 14 : Principe du test ELISA : HIV Ag/Ab combo ELISA 4.0 de MP diagnostic (Rudolf et al., 2005)**

### *Mode opératoire*

#### **1. Préparation réactifs :**

Laisser les réactifs et l'échantillon à température ambiante entre (18-30 C □) pendant au moins 15 à 30 minutes vérifier la présence de cristaux de sel dans le tampon de lavage concentré. Si des cristaux se sont formés, dissoudre par réchauffement à 37 C □ jusqu'à dissolution des cristaux. Diluer le tampon de lavage de 1 à 20 avec l'eau distillée ou desionisée. Utilisez uniquement des récipients propres pour diluer le tampon.

#### **2. Numération des puits :**

Définissez le nombre de puits et de barrettes nécessaires pour les échantillons et les contrôles dont trois témoins négatifs (B1, C1, D1), trois contrôles positifs (un pour le VIH1, VIH-2 et une autre Ag VIH contrôles (E1, F1, G1) et un blanc A1, ni échantillons ni conjugué-HRP ne doit être ajouté dans le puits blanc.

#### **3. Distribution du réactif conjugué à la biotine :**

Déposer 20 ul anti VIH-p24 biotinylés dans chaque puits sauf dans les puits A1.

#### **4. Ajout des échantillons et des contrôles :**

Ajouté 100ul d'échantillons et des contrôles dans leurs puits respectifs.

### 5. Incubation (1) :

Couvrir la plaque avec le couvercle de la plaque et incuber pendant 60 minutes à 37 C □ il est recommander d'utiliser un réservoir d'eau contrôlé par thermostat pour assurer une bonne température et la stabilité de l'humidité au cours de l'incubation.

### 6. Lavage (1) :

A la fin de l'incubation, retirez et jetez le couvercle de la plaque.

Laver chaque puits 5 fois avec tampon de lavage dilué. Chaque cycle, laisser les puits à température pendant 30-60 secondes. Après le cycle de lavage final, tournez la plaque vers le bas sur du papier absorbant ou une serviette propre, et tapoter pour enlever les liquides restant.

### 7. Distribution du conjugués-HRP :

Distribuer 100ul de conjugué HRP dans chaque puits sauf dans le puits A1.

### 8. Incubation (2) :

Couvrir la plaque avec le couvercle de la plaque et incuber pendant 30 minutes à 37 C°.

### 9. Lavage (2) :

Après la fin de l'incubation, retirez et jetez le couvercle de la plaque.

Lavez chaque puits 5 fois avec le tampon de lavage dilué.

### 10. Coloration :

Distribuer 50 ul de solution chromogène A et 50ul de chromogène B dans chaque puits, y compris le blanc, ne pas couvrir la plaque.

Incuber la plaque à 37 C° pendant 15 minutes en évitant la lumière directe. La réaction enzymatique entre les solutions chromogènes et le HRP produit la couleur bleu dans le contrôle positif et les échantillons positifs en antigènes et / ou en anticorps VIH 1/2.

### 11. Solution d'arrêt :

Distribuer 50ul de solution d'arrêt dans chaque puits en utilisant une pipette multicanaux ou micropipette et mélanger doucement .une couleur jaune intense se développe dans le contrôle positif et les échantillons positifs en antigène et /ou en anticorps VIH 1/2.

### 12. Mesure de l'absorbance :

Lire l'absorbance à 40 nm.si un instrument à double filtre est utilisé, réglez la longueur d'onde de référence à 630 nm .calculer la valeur seuil et évaluer les résultats.

La lecture s'effectue au spectrophotomètre à 450 / 620 nm.

### *Interprétation des résultats*

➤ **Calcul :**

1. Calcul de l'absorbance moyenne du contrôle non réactif (NRC) :

$$M = \frac{DO (B1) + DO (C1) + DO (D1)}{3}$$

2. Calcul de la valeur seuil:

$$VS = M + \text{constant (0.12)}.$$

➤ **Validation du test :**

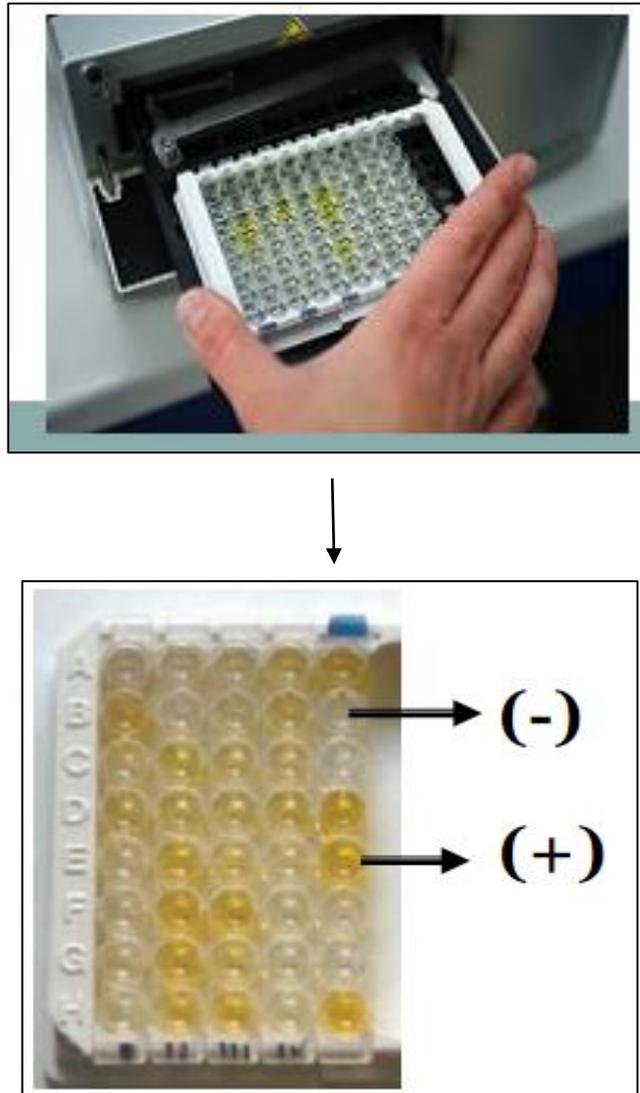
Contrôle de qualité :

La valeur de DO de chaque contrôle positif doit être  $\geq 0.8$  à 450 nm

La valeur de DO de chaque contrôle négatif doit être  $< 0.1$  à 450 nm

➤ **Interprétation des résultats :**

- ✓ Densité optique de l'échantillon  $>$  Valeur seuil  $\rightarrow$  **résultat positif (présence d'Ag p24)  $\rightarrow$  jaune**
- ✓ Densité optique de l'échantillon  $<$  Valeur seuil  $\rightarrow$  **résultat négatif (absence d'Ag p24)  $\rightarrow$  incolore**



**Figure 15 : Résultat de test d'ELISA**

**C. Test de confirmation (WESTERN BLOT) HIV BLOT 2.2 de MP DIAGNOSTICS (MPD).**

***Définition***

C'est un test qualitatif basé sur la méthode immuno-enzymatique pour la détection in-vitro des anticorps dirigés contre le VIH1/2 dans le plasma ou le sérum humain.

Il s'agit d'un test complémentaire très spécifique appliqué sur les échantillons trouvés positifs ou discordants avec les méthodes de screening telles que l'ELISA ou MEIA.

### *Principe*

Le test repose sur le principe de l'ELISA indirecte sur bandelette de nitrocellulose contenant les protéines constitutives du virus VIH1/2 et un contrôle interne anti-IgG. La bande de contrôle interne permet de valider l'addition de l'échantillon, des réactifs et le bon déroulement du protocole opératoire.

Les protéines du virus VIH sont inactivées, séparées, en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, puis électrotransférées sur membrane de nitrocellulose.

La mise en œuvre du test comprend les étapes suivantes :

- ❖ Une réhydratation des bandelettes suivies d'une incubation des échantillons à confirmer ou les sérums du contrôle.
- ❖ Les anticorps éventuellement présents dans le prélèvement se lient aux protéines virales présentes sur la bandelette.
- ❖ Après lavage, on ajoute des Ac anti-IgG humains marqués (conjugué) à la phosphatase alcaline qui, ces Ac vont se lier aux Ac anti-VIH retenus sur le support solide.
- ❖ Après lavage, et élimination du conjugué en excès, la solution de révélation permet de mettre en évidence l'activité enzymatique des complexes liés à la nitrocellulose.
- ❖ L'apparition de bandes colorées spécifiques permet de mettre en évidence la présence d'Ac anti-VIH dans l'échantillon (figure 16).

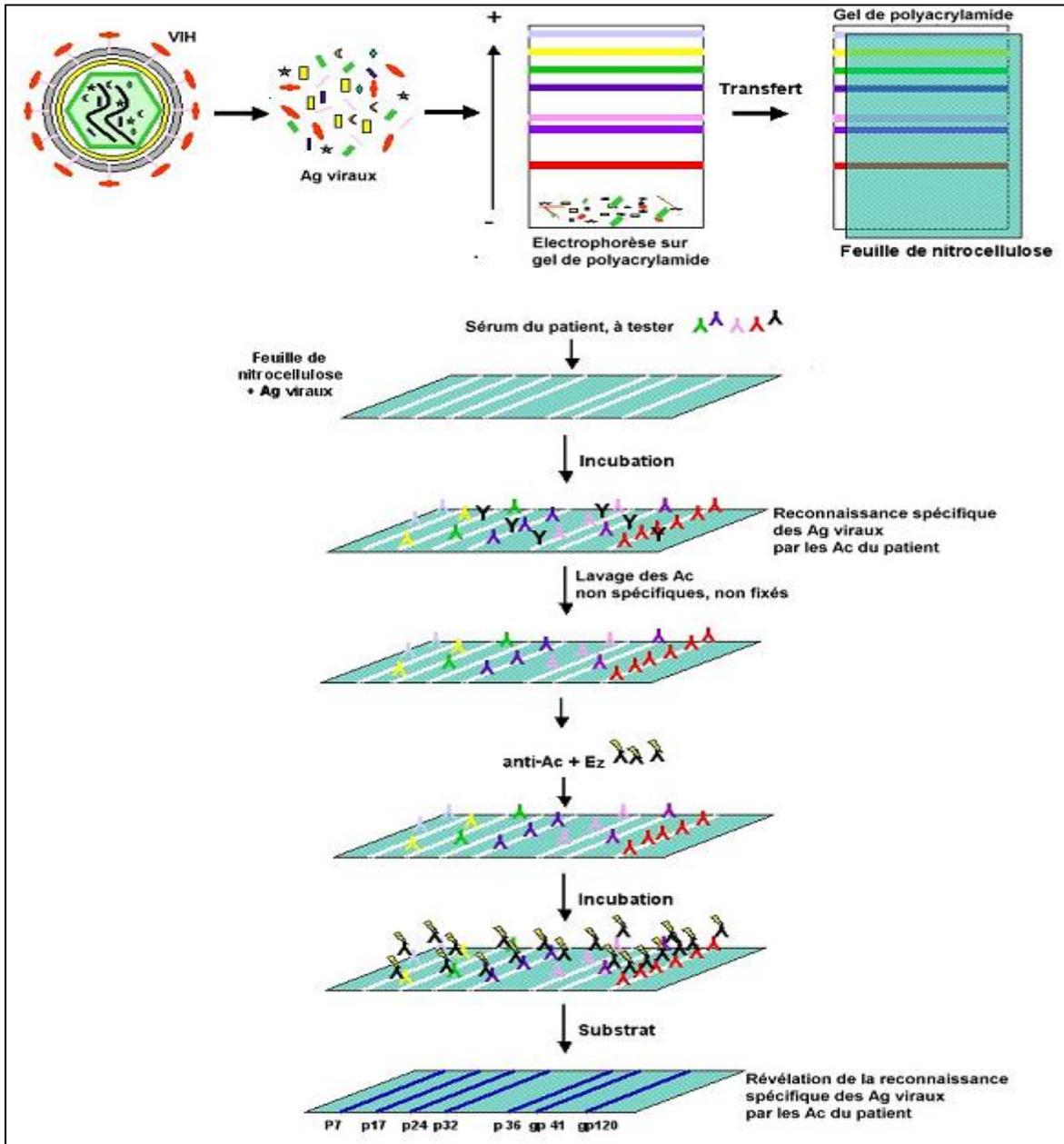


Figure 16 : Principe du western blot (Alegria-Schaffer et *al.*, 2009)

**Mode opératoire**

**1. Préparation réactifs et Les bandelettes :**

Avant l'utilisation, il est nécessaire d'attendre 30 min pour que les réactifs s'équilibrent à la température du laboratoire (18 à 30 C°), puis s'assurer que la face des bandelettes comportant le trait de repère et la numération est visible afin que les protéines virales

présentes sur cette face soit recouverte par les différents réactifs tout au long de la manipulation.

Les bandelettes doivent être manipulées soigneusement à l'aide d'une pince en plastique.

### **2. Numération des puits :**

En utilisant les pinces brucelles, sortir avec précaution du tube le nombre de BANDELETES nécessaires. En placer une par puits, coté des numéros vers le haut, inclure une bandelette pour chacun des contrôles, fortement réactif, faiblement réactif et négatif.

### **3. Distribution du tampon de lavage :**

Ajouté 2 ml de TAMPON DE LAVAGE DILUE dans chaque puits.

### **4. Incubation :**

Laisser incuber les bandelettes pendant 1 à 2 minutes à température ambiante 25 C° sur un plateau oscillant.

### **5. Distribution du TAMPON de dilution :**

Ajouté 2ml de TAMPON DE DILUTION dans chaque puits.

### **6. Ajout des échantillons et des contrôles :**

Ajouté 20 ul d'échantillon patient dans les puits appropriés.

### **7. Incubation (1) :**

Couvrir le plateau d'incubation avec le couvercle fourni et laisser incuber pendant 1 heure à température ambiante 25 C° sur le plateau oscillant.

Enlever avec précaution le couvercle en évitant de provoquer des éclaboussures ou un mélange d'échantillon .Pencher le plateau pour aspirer le mélange liquide des puits. Changer d'embout à chaque échantillon pour éviter les contaminations croisées.

### **8. Lavage (1) :**

Laver chaque bandelette 3 fois avec 2 ml de TAMPON DE LAVAGE DILUE en laissant un temps de trempage de 5 minutes sur le plateau oscillant entre chaque lavage.

### **9. Distribution du conjugué :**

Distribuer 2 ml de SOLUTION DE CONJUGUE dans chaque puits.

### **10. Incubation (2) :**

Couvrir le plateau et laisser incuber pendant 1 heure à température ambiante 25 C° sur le plateau.

### **11. Solution d'arrêt :**

Aspirer le CONJUGUE des puits

Distribuer 2ml de SOLUTION SUBSTART à chaque puits pour stoppée la réaction.

### 12. Incubation (3) :

Couvrir le plateau et laisser incuber pendant 15 minutes sur le plateau.

### 13. Lavage (1) :

Aspirer le SUBSTART et rincer les bandelettes ou moins trois fois avec de l'eau ultra-pure pour stopper la réaction.

### 14. L'interprétation visuelle :

A l'aide de la pince brucelles, retirer délicatement les bandelettes et les déposer sur du papier absorbant.

Placer les bandelettes sur une feuille de papier blanc et non absorbant pour l'interprétation des résultats.

#### Validation du test :

##### ✓ Contrôle de qualité :

##### ➤ Contrôle non réactif :

Aucune bande spécifique au VIH-1 ou au VIH-2 ne doit apparaître sur les bandelettes de contrôle négatif.

La bande de contrôle d'échantillon doit être visible.

##### ➤ Contrôle fortement réactif :

Toutes les bandes aux poids moléculaire pertinents doivent être visibles (p17, p24, p31, gp41, p51, p55, p66, gp 120).

La bande de contrôle d'échantillon doit être visible.

##### ➤ Contrôle faiblement réactif :

Des bandes de faible intensité pour p24 et /ou gp 41 et gp 120/gp 160 peuvent apparaître.

La bande de contrôle d'échantillon doit être visible.

#### *Interprétation des résultats*

La présence d'anticorps anti protéines constitutives du virus VIH-1 dans les échantillons se traduit par l'apparition de bandes spécifiques colorées (bleu violet), leur position correspond aux masses moléculaires (kDa) des protéines virales répertoriées dans le tableau suivant :

**Tableau IV: Aspect des constituants viraux en western blot**

DENOMINATION	gene	NATURE	ASPECT EN WESTERN BLOT
<b>GP 160</b>	env	Glycoprotéine précurseur de la GP 41	Bande large et diffuse
<b>GP 120</b>	env	Glycoprotéine d'enveloppe.	Bande diffuse
<b>P 66</b>	pol	Transcriptase inverse.	Bande fine
<b>P55</b>	gag	Précurseur des protéines internes.	Bande fine
<b>P51</b>	pol	Transcriptase inverse.	Bande fine juste en dessous de p 55
<b>GP 41</b>	env	Glycoprotéine transmembranaire	Bande diffuse
<b>P 39</b>	gag	Fragment de p 55	Bande fine
<b>P 31</b>	pol	Endonucléase	Double bande
<b>P 24</b>	gag	Protéine du noyau	Bande large
<b>P 17</b>	gag	Protéine du noyau	Bande large

**(Trousse WESTERN BLOT)**

Selon le critère de positivité de l'OMS, on interprète les résultats de la manière suivante :

- ❖ **Positif** : présence de 2 protéines d'enveloppe + 1 protéine Gag.

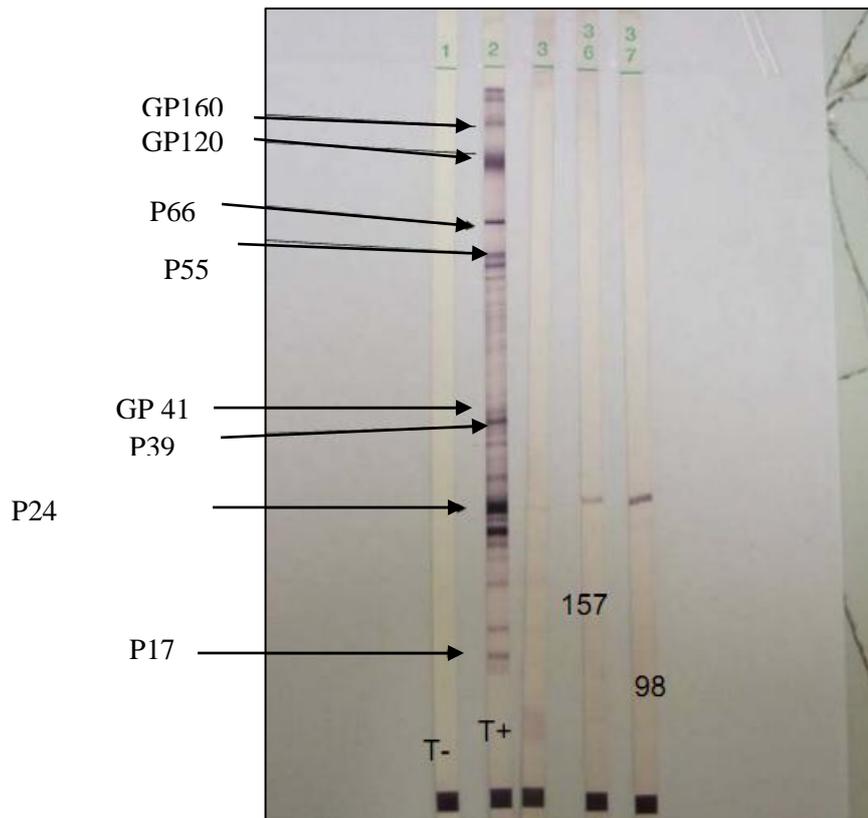
Ou

Présence de 2 protéines d'enveloppe + protéine Pol.

- ❖ **Indéterminé** : présence de bande virale spécifique P24, P17, p55, P51.
- ❖ **Négatif** : Aucune bande virale spécifique.

Ou

Détection uniquement des anticorps p17, sans aucune autre bande.



**Figure 17 : Résultat de test WESTERN BLOT**

**D. Test COBAS® AmpliPrep/ COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, version 2.0 (Roche)  
PCR en temps réel :**

***Définition***

C'est un test basé sur l'amplification *in vitro* de l'acide nucléique. Il permet la mesure quantitative de l'ARN du virus de l'immunodéficience dans le plasma humain.



**Figure 18 : Automate de PCR en temps réel COBAS et l'amplificateur COBAS TaqMan 48**

### *Principe*

Consiste à la mesure quantitative en continu de l'ARN du VIH1 dans le plasma humain, par fluorescence des produits d'amplification au fur et à mesure de leur production à chaque cycle d'amplification (en temps réel).

Ce test permet la préparation automatisée des échantillons dans le but d'isoler l'ARN viral, suivie de la transcription inverse de l'ARN cible pour produire de l'ADN complémentaire puis, de l'amplification par PCR de l'ADNc cible en même temps que la détection de produits amplifiés par l'utilisation de sondes oligonucleotidiques doublement marquées, spécifiques de la cible.

#### **1) La préparation des échantillons dans le but d'isoler l'ARN du VIH-1 (extraction) : (COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan, v2.0)**

- Préparation automatisée des échantillons à l'aide d'une capture à base de silice.
- Lyse de particules de VIH-1 à T° élevée et à l'aide d'une protéase.
- Libération et protection d'acides nucléiques contre des ARNase par un tampon de liaison/lyse.
- Introduction dans le mélange de : protéase, quantité connue d'ARN « Amored » du QS du VIH-1 (construction d'ARN « Armored » non infectieux qui contient

des sites de liaison aux amorces identiques à ceux de l'ARN cible et un site unique de liaison à la sonde qui permet de distinguer l'amplicon du QS du VIH-1 de l'amplicon cible du VIH-1), réactif de lyse et particules magnétiques en verre.

- Incubation du mélange et fixation des ARN cibles et ARN du QS du VIH-1 sur la surface des particules en verre.
- Lavage du mélange et séparation des acides nucléiques des particules magnétiques en verre.
- Elution à T° élevée des acides nucléiques avec une solution aqueuse.

### 2) La transcription inverse de l'ARN cible pour produire l'ADN complémentaire (ADNc) (COBAS/TaqMan)

- En présence d'ADN polymérase de l'enzyme recombinante thermostable (Z05), de manganèse ( $Mn^{2+}$ ) et sous conditions tampons appropriées, la transcription inverse et l'amplification sont effectuées en même temps que la détection en temps réel de l'amplicon.
- Les échantillons traités sont ajoutés au mélange d'amplification dans des tubes d'amplification où s'effectuent la transcription inverse et l'amplification.
- Chauffage du mélange réactionnel pour permettre aux amorces antisens de s'hybrider spécifiquement à l'ARN cible du VIH-1 et à l'ARN du QS.
- En présence de  $Mn^{2+}$  et d'un excès de désoxynucléotides triphosphates (dNTPs), la Z05 allonge les amorces hybridées.
- Production de brins d'ADN complémentaire de l'ARN cible.

### 3) L'amplification par PCR (COBAS/TaqMan)

#### Amplification de la cible

- Dénaturation des hybrides ARN:ADNc par chauffage du mélange réactionnel par le thermocycleur.
- Hybridation des amorces à l'ADN cible pendant que le mélange refroidisse.
- En présence de  $Mn^{2+}$  et un excès des dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dUTP, dTTP), la Z05 allonge les amorces hybridées le long des matrices cibles qui génère des molécules d'ADN bicentenaires appelé « AMPLICON ».
- L'analyseur répète automatiquement cette opération pendant un nombre de cycle défini, chaque cycle doublant effectivement la quantité d'ADN de l'amplicon.

### Mode opératoire

Nous avons suivi la procédure suivante :

- Préparation des échantillons et contrôles.
- Préparation de l'appareil COBAS<sup>®</sup> AmpliPrep.
- Mettre la station de travail du logiciel AMPLILINK sous tension **on**.
- Chargement des cassettes de réactifs et les échantillons.
- Configurer notre appareil.
- Création d'une liste contenant les échantillons à étudier.
- Lancement du processus.

### Interprétation des résultats

Indélectable → Absence de copies d'ARN → négatif

Délectable → Présence de copies d'ARN → positif

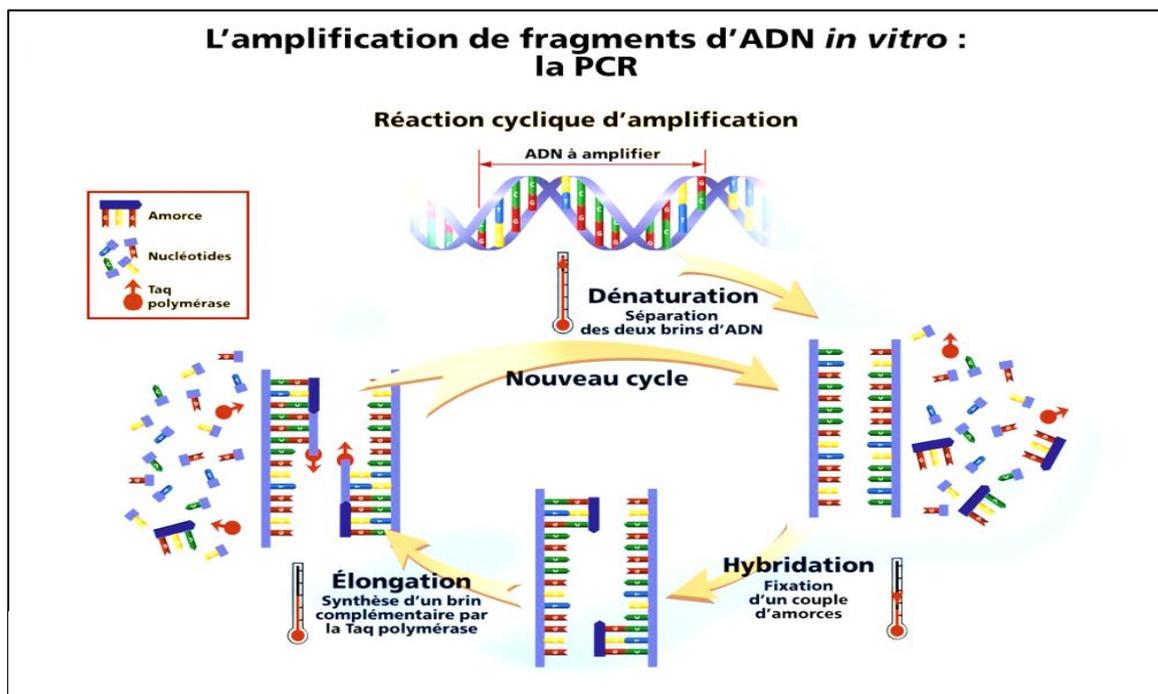


Figure 19 : Principe de la PCR (TAHMINUR RAHMAN et *al.*, 2013)



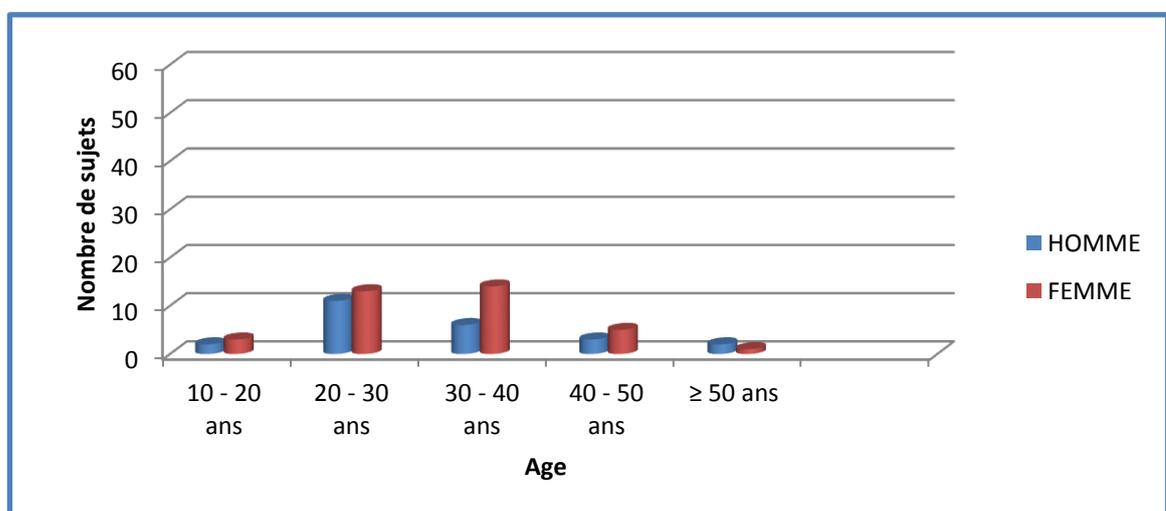
### III.1. Caractéristiques de la population

#### III.1.1. Selon le sexe et l'âge

Notre échantillon était composé de sujets appartenant à différentes tranches d'âge, et la répartition des sexes a été hétérogène, avec une légère prédominance des femmes avec un pourcentage de 60% qui comptaient parmi elles des femmes enceintes, et un pourcentage de 40% pour les hommes. Nous avons observé notamment que les sujets de notre étude appartiennent majoritairement à la tranche d'âge entre 20-40 ans avec une moyenne d'âge de 30 ans.

**Tableau V: Caractéristiques de la population selon le sexe et l'âge.**

Age	HOMME	FEMME	TOTAL
10 – 20 ans	2	3	5
20 – 30 ans	11	13	24
30 – 40 ans	6	14	20
40 – 50 ans	3	5	8
≥ 50 ans	2	1	3
Total	24	36	60
Pourcentage	40%	60%	100%



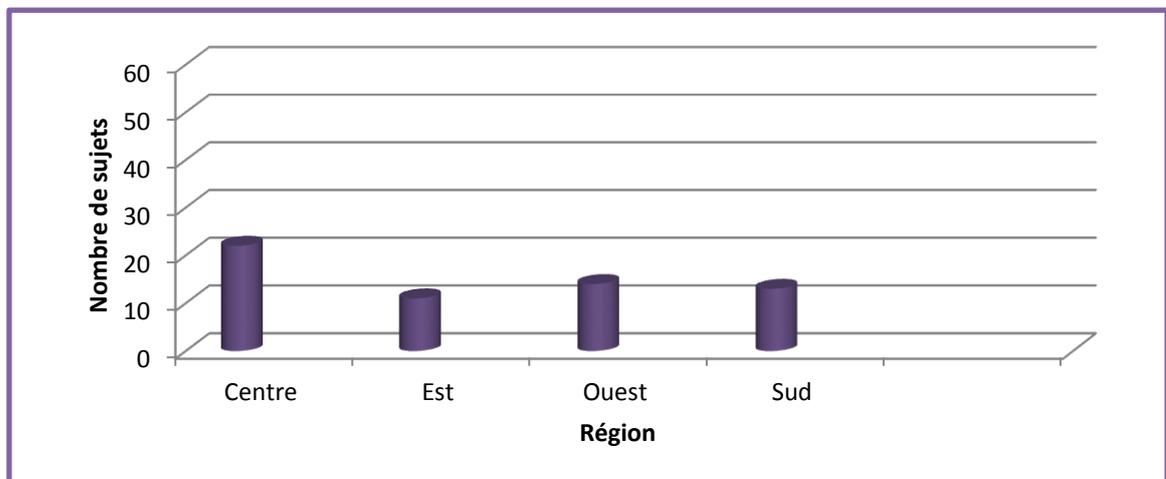
**Figure 20 : Caractéristiques de la population étudiée selon l'âge et le sexe.**

### III.1.2. Selon la région

Nous avons notamment trouvé que ces individus provenaient de différents secteurs, mais la plupart des sujets venant pour confirmer le résultat proviennent de la région du centre avec 22 individus.

**Tableau VI : Caractéristiques de la population étudiée selon la région.**

Région	Effectif
Est	11
Ouest	14
Sud	13
Centre	22
Total	60



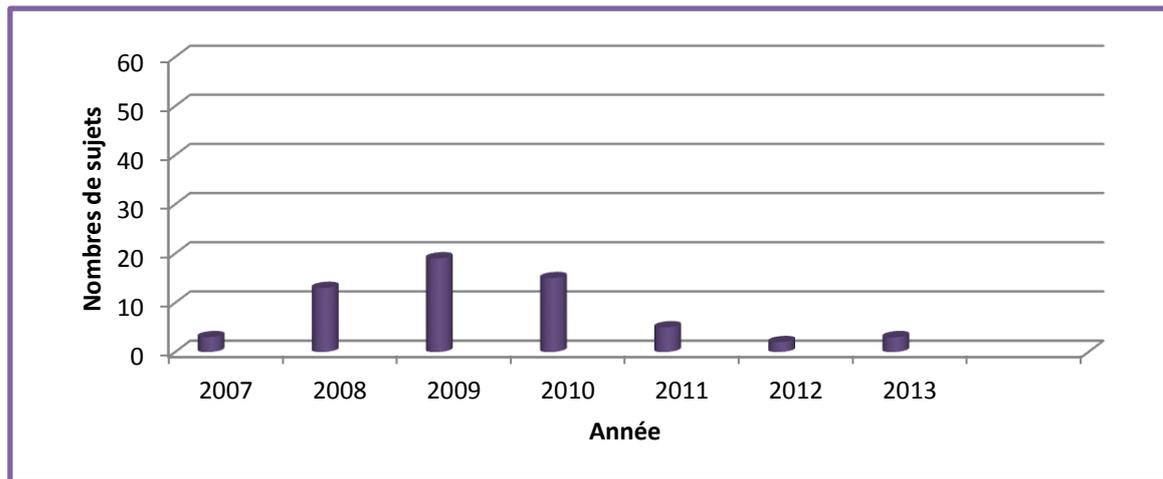
**Figure 21: Caractéristique de la population étudiée selon la région.**

### III.1.3. Selon l'année

La majorité des sujets de cette étude s'est présentée pour un dépistage VIH surtout entre les années 2008 et 2010.

**Tableau VII : Répartition de la population étudiée selon l'année.**

L'année	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Sujets	3	13	19	15	5	2	3

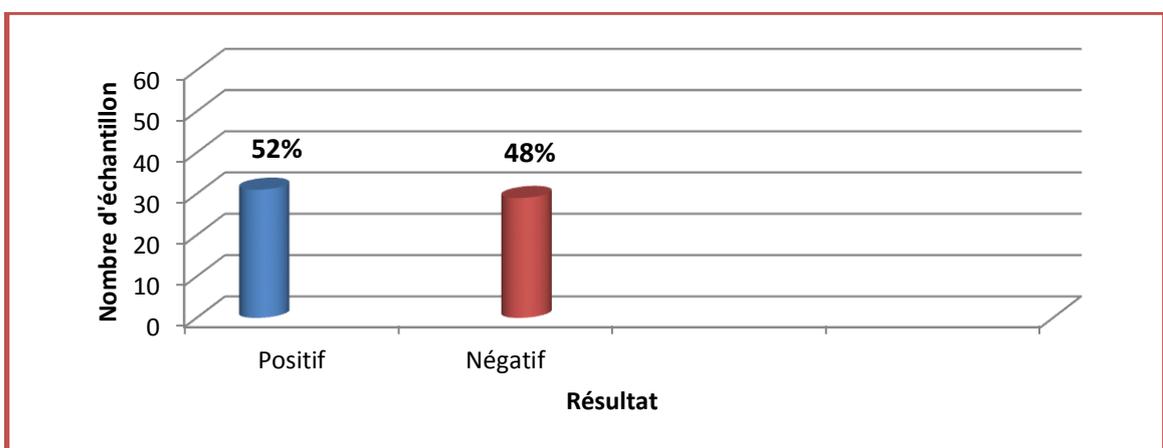


**Figure 22 : Caractéristiques de la population étudiée selon l'année.**

### III.2. Résultats des tests

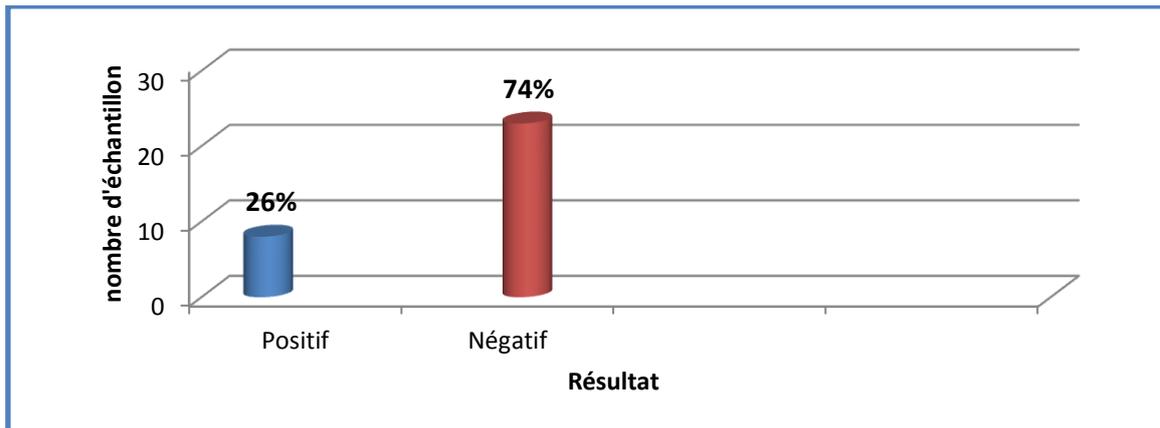
Dans ce travail, la recherche des différents paramètres virologiques réalisée sur les 60 sérums par les techniques : MEIA, ELISA, Western blot et PCR, a donné les résultats suivants :

#### III.2.1. Test MEIA (AxSYM).



**Figure 23 : Résultat du test MEIA sur 60 échantillons.**

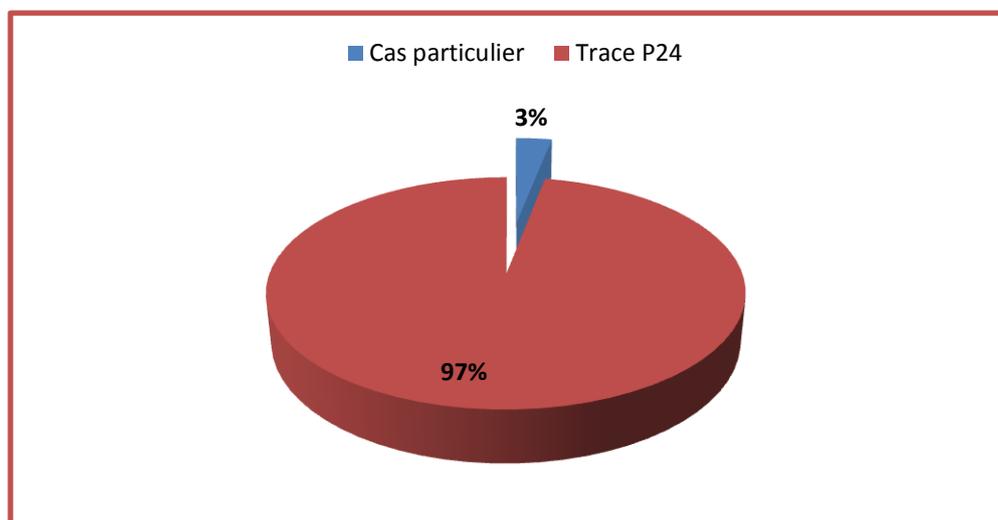
Sur les 60 sérums nous avons obtenus 31 sérums positifs et 29 sérums négatifs en anticorps VIH avec le test AxSYM.

**III.2.2. Test ELISA combiné****Figure 24 : Résultat du test ELISA sur 31 échantillons.**

Sur les 31 sérums trouvés positifs en MEIA, nous avons obtenu 8 sérums avec un résultat positif et 23 sérums avec un résultat négatif en anticorps /antigène VIH avec le test ELISA.

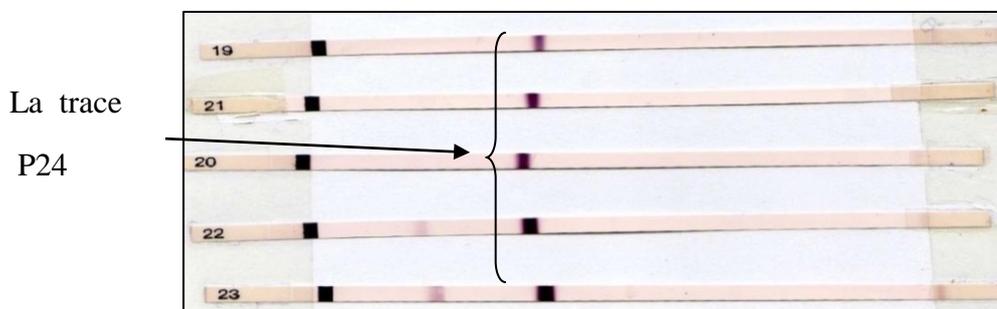
**III.2.3. Résultat du test Western blot****Tableau VIII: Résultat du test Western blot**

	<b>Effectif</b>	<b>Pourcentage</b>
<b>Trace de P24</b>	<b>30</b>	<b>97%</b>
<b>Cas particulier</b>	<b>1</b>	<b>3%</b>
<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>100%</b>

**Figure 25 : Résultat du test Western blot sur 31 échantillons.**

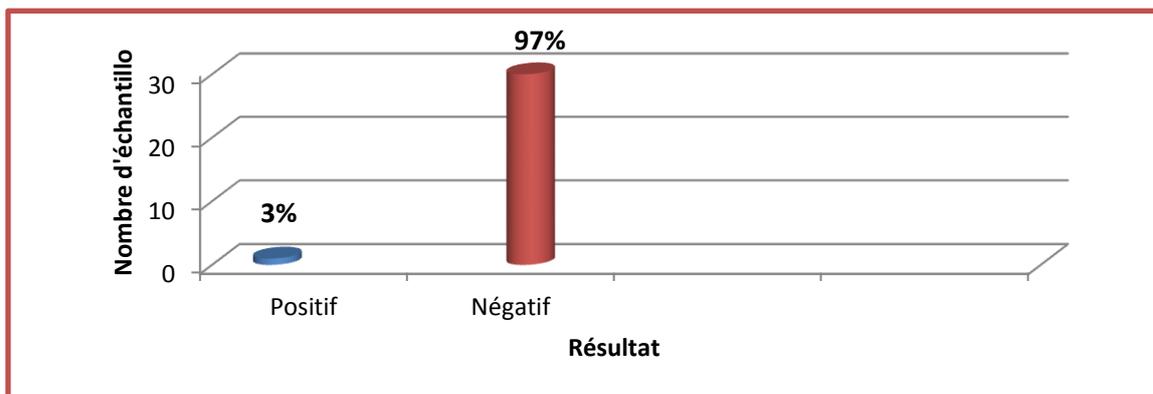
La totalité des 31 sérums ont présenté une trace de P24 en western blot.

Durant notre travail, en 2013 nous avons croisé un cas particulier qui a présenté une trace P24 durant les 3 mois de suivi, et après le 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> prélèvement, nous avons remarqué la présence d'autres traces de protéines gp160.



**Figure 26 : Résultat WB du cas particulier.**

#### III.2.4. Polymerase Chain Reaction (PCR)



**Figure 27 : Résultat de la PCR sur 31 échantillons.**

Sur les 31 sérums, nous avons obtenu 30 sérums négatifs en ARN VIH, et un seul sérum positif en ARN VIH (cas particulier).

Le tableau ci-dessous représente une récapitulation des résultats obtenus durant notre étude et après la réalisation des différents tests de diagnostic de l'infection à VIH.

**Tableau IX : Résultats des tests MEIA, ELISA, WB et PCR**

	MEIA (Ac)	ELISA (Ac/Ag)	WB (P24)	PCR (ARN)	Interprétation
S1	Positif	Positif	Trace	Négatif	Négatif
S2	Positif	Négatif	Trace	Négatif	Négatif
S3	Positif	Négatif	Trace	Négatif	Négatif
S4	Positif	Négatif	Trace	Négatif	Négatif
S5	Positif	Positif	Trace	Négatif	Négatif
S6	Positif	Positif	Trace	Négatif	Négatif
S7	Positif	Négatif	Trace	Négatif	Négatif
S8	Positif	Négatif	Trace	Négatif	Négatif
S9	Positif	Négatif	Trace	Négatif	Négatif
S10	Positif	Négatif	Trace	Négatif	Négatif
S11	Positif	Négatif	Trace	Négatif	Négatif
S12	Positif	Positif	Trace	Négatif	Négatif
S13	Positif	Négatif	Trace	Négatif	Négatif
S14	Positif	Négatif	Trace	Négatif	Négatif
S15	Positif	Négatif	Trace	Négatif	Négatif
S16	Positif	Positif	Trace	Négatif	Négatif
S17	Positif	Négatif	Trace	Négatif	Négatif
S18	Positif	Négatif	Trace	Négatif	Négatif
S19	Positif	Négatif	Trace	Négatif	Négatif
S20	Positif	Négatif	Trace	Négatif	Négatif
S21	Positif	Négatif	Trace	Négatif	Négatif
S22	Positif	Négatif	Trace	Négatif	Négatif
S23	Positif	Positif	Trace	Négatif	Négatif
S24	Positif	Négatif	Trace	Négatif	Négatif
S25	Positif	Positif	Trace	Négatif	Négatif
S26	Positif	Négatif	Trace	Négatif	Négatif
S27	Positif	Négatif	Trace	Négatif	Négatif
S28	Positif	Négatif	Trace	Négatif	Négatif
S29	Positif	Positif	Trace	Négatif	Négatif
S30	Positif	Négatif	Trace	Négatif	Négatif
S31	Positif	Positif	Bandes	Positif	Positif

### III.3. Discussion

Le diagnostic biologique de l'infection VIH est avant tout un diagnostic sérologique basé sur la recherche spécifique d'anticorps anti-VIH 1/2 dans le sang du patient. Il comporte une étape de dépistage suivie d'une étape de confirmation ; il repose sur un algorithme à tests multiples destinés à détecter les anticorps anti-VIH.

L'algorithme d'analyse dit « conventionnel » utilise un test immuno-enzymatique pour le dépistage des échantillons, et ceux trouvés positifs ou indéterminés sont ensuite confirmés par un test de confirmation qui est le Western-Blot.

L'algorithme d'analyse dit « alternatif » se base sur une combinaison de tests de dépistage sans Western-Blot. L'algorithme conventionnel a beaucoup d'inconvénients, à savoir : les résultats indéterminés donnés par le Blot ainsi que son coût élevé, l'exigence d'une qualification technique et d'un laboratoire bien équipé. Pour cette raison, l'OMS conseille maintenant le remplacement de l'algorithme conventionnel par l'algorithme alternatif à condition que le premier test soit très sensible ( $\geq 99\%$ ) et le second spécifique ( $\geq 98\%$ ) (ONUSIDA / OMS, 1997). Cette nouvelle stratégie a grandement amélioré les conditions de dépistage de l'infection à VIH dans les pays à ressources limitées puisqu'elle permet de donner la même qualité de résultats à moindre coût.

Avec toute la variété de tests de dépistage qui existe sur le marché international, la technique de référence pour confirmer la présence d'une infection à VIH reste le western-Blot. Il est pratiqué sur un deuxième prélèvement lorsque les tests de dépistage réalisés sur le premier prélèvement sont positifs ou discordants. Ce test détecte les anticorps anti-VIH dirigés contre les différentes protéines du VIH1/2 par une réaction immuno-enzymatique sous forme de bandes colorées. En raison des profils indéterminés et de son coût, beaucoup de laboratoires ne disposent pas malheureusement de ce test pour diagnostiquer une infection à VIH.

L'analyse de la population incluse dans cette étude, montre que les sujets appartiennent à différentes tranches d'âge, et sont surtout des adultes jeunes, d'âge moyen égal à 30 ans ; un âge où l'activité sexuelle est importante. Nous constatons une légère prédominance du sexe féminin (60 % versus 40%) avec une provenance des différentes wilayas du pays.

Ces caractéristiques concordent avec celles rapportées par le LNR VIH/SIDA, qui stipule que le dépistage de l'infection VIH en Algérie se fait à travers tout le territoire national, et concerne surtout les adultes jeunes qui sont en pleine activité sexuelle.

Il faut noter que notre étude a été réalisée sur un seul prélèvement, car les patients ne revenaient pas pour refaire d'autres prélèvements qui s'imposent dans ce cas de figure, afin de suivre l'évolution de chaque cas, et pouvoir poser un diagnostic de certitude.

Dans notre étude, nous avons débuté avec le test MEIA pour la recherche des Ac anti-VIH, car ce test performant représente une très grande sensibilité visant la moindre concentration d'anticorps anti VIH. Les résultats ont donné 31 échantillons positifs, et 29 négatifs en Ac anti-VIH. La grande sensibilité du MEIA qui le rend un bon test de dépistage nous a permis d'écarter les échantillons négatifs (un résultat négatif en MEIA suffit pour éliminer une infection VIH).

Les 31 échantillons positifs en MEIA, ont été analysés par ELISA, et ont donné : 8 résultats positifs et 23 négatifs en anticorps. Donc, nous avons obtenu 8 échantillons concordants (positifs), et 23 résultats discordants avec les 2 techniques sérologiques. L'obtention des résultats discordants confirme la nécessité d'utiliser au moins 2 techniques sérologiques de sensibilité élevée, afin d'éviter un diagnostic erroné. Donc, nous ne pouvons confirmer une infection VIH à partir d'un seul test.

Les 31 échantillons ont été aussi analysés par le western blot, tous ces échantillons ont donné une bande isolée de la protéine p24 et donc un résultat indéterminé.

Les Western blot indéterminés posent problème à différents niveaux, ce genre de résultats demande plus de travail, et d'exploration par le laboratoire, et donc plus de moyens. Il entrave les décisions cliniques prises par le médecin prescripteur, et cause une anxiété inappropriée.

Ce genre de résultats exige un suivi de malades, et le laboratoire doit utiliser tous les moyens nécessaires afin de poser un diagnostic de certitude. Pour cela, le suivi de ces individus est crucial, et tous les renseignements obtenus aident à l'interprétation des résultats, qui doit être faite avec prudence.

La primo-infection VIH-1 peut être une cause d'un résultat indéterminé (les anticorps anti VIH ne sont pas encore tous formés), le suivi du malade est donc déterminant afin de voir l'évolution du profil. Un deuxième prélèvement est ainsi demandé 2 à 4 semaines après le premier. En cas d'une primo-infection, il y'a apparition des autres bandes. En revanche, devant la persistance d'un résultat indéterminé, surtout si les renseignements donnés indiquent une possible contamination, on se trouve devant la nécessité de suivre le malade pendant plusieurs semaines, ce qui n'est pas toujours évident. Généralement, devant ce cas de figure, les malades sont perdus de vue.

Afin de palier à toutes les contraintes liées à ces résultats, et la perte de temps engendrée, le recours à la biologie moléculaire s'avère la meilleure solution.

La recherche de l'ARN viral par PCR trouve tout son intérêt devant ces résultats, et permet d'affirmer ou confirmer l'infection. En effet, la cinétique des marqueurs virologiques montre que l'ARN plasmatique est détectable dès le 10<sup>e</sup> jour (**8 à 17 jours en moyenne**) suivi de l'Ag p24 vers le 15<sup>e</sup> jour (**12 à 26 jours**) puis des anticorps anti VIH vers le 21<sup>e</sup> jour (**20 à 45 jours**), ce qui rend la fenêtre sérologique de la PCR plus étroite par rapport aux autres techniques sérologiques. Malheureusement, ces techniques moléculaires coûteuses ne sont pas accessibles dans tous les laboratoires.

Sur cette base, notre étude a porté sur la recherche de l'ARN VIH par PCR sur les 31 échantillons indéterminés afin de pouvoir confirmer ou affirmer l'infection, et d'apprécier globalement l'évolution et l'interprétation des résultats indéterminés.

Sur le total des 31 échantillons analysés par PCR, 30 étaient indétectables en ARN et un seul échantillon était positif en ARN-VIH plasmatique.

L'absence d'ARN viral dans nos échantillons, confirme qu'il y a bien absence d'infection par ce virus, et par conséquent ces échantillons sont négatifs en Ac anti-VIH.

Par conséquent, on constate que la majorité des résultats indéterminés au Western blot ne sont pas liés à une infection VIH.

Cette constatation semble également avoir été rapportée dans plusieurs études. On cite par exemple l'étude Saoudienne (King Fahd General Hospital) qui a été effectuée sur 214 prélèvements dont les résultats étaient positifs en ELISA 3<sup>e</sup> génération et indéterminés au

Western blot. Ces prélèvements n'ont pas été analysés par une PCR, mais les auteurs ont suivi l'évolution des sujets pendant plusieurs mois, l'analyse de plusieurs prélèvements ultérieurs a montré que la majorité des résultats demeuraient négatifs (66%) ou sont restés indéterminés (31%), avec 3% uniquement qui sont devenus positifs (**Ghazi et al., 1997**).

On cite aussi une étude Tunisienne qui a été effectuée sur 466 prélèvements retrouvés indéterminés au western blot. Tous ces échantillons ont été ultérieurement analysés par la PCR. Les auteurs ont constaté que les prélèvements considérés comme indéterminés selon les critères d'interprétation de l'OMS et CDC sont toujours négatifs en PCR (ARN indétectable) ; ce qui laisse suggérer que les échantillons retrouvés indéterminés à deux reprises devraient être déclarés négatifs (**Fethi Tebourski, et al., 2003**).

A partir de tous ces résultats, nous pouvons déduire que les Western blot indéterminés sont souvent liés à des causes autres qu'une primo-infection. Différents scientifiques ont proposé plusieurs explications à ce profil.

La présence d'un profil p24 isolée, correspond dans la majorité des cas à des réactions non spécifiques (**VALENDAR et al., 1993**) liées à des états physiologiques tels que la grossesse (par la présence d'Allo-anticorps qui interfèrent avec les anticorps présents dans les kits, et qui disparaissent après l'accouchement) (**Bocket et al., 2009 ; Ministry of Health; of Japan, 2007**) ou des états pathologiques tels que les maladies auto-immunes (**Vinay et al., 2010**), Hypergammaglobulinémie (**Basch et Sattern, 1997**), ou autres infections.

Les renseignements cliniques ont montré que parmi les 31 femmes incluses dans notre étude, 4 étaient enceintes, leurs résultats étaient positifs en MEIA, négatifs en ELISA avec une trace de protéine p24 et une PCR négative. Le suivi de ces femmes donne généralement une disparition de cette bande après l'accouchement.

L'adoption des critères de l'OMS pour interpréter des WB indéterminés, a permis de confirmer l'absence de l'infection VIH chez 30 patients de notre étude. Cela a été confirmé par la recherche de l'ARN viral du VIH. De ce fait, la prise en charge sera immédiate et évitera la perte de vue des patients en cas de suivi pour confirmation de l'infection.

L'ARN viral a été détecté dans un seul sérum parmi les 8 prélèvements trouvés positifs en Ac anti-VIH par les deux tests sérologiques et indéterminé par le Blot. En parallèle, au cours de notre étude, ce sujet a été suivi par la réalisation de plusieurs prélèvements sur lesquels on a effectué le western blot. Les résultats sont restés indéterminés, et au bout du 4eme prélèvement (3mois après le premier), il y a eu une évolution de profil avec apparition d'autres bandes (gp120, p17), ce qui correspond à une séroconversion. Les résultats de ce suivi concordent avec les résultats obtenus par PCR et ont permis la confirmation de l'infection.

En effet, la présence d'un seul profil indéterminé sur un seul western-Blot, n'exclue pas la présence d'une infection à VIH. Il est nécessaire d'exiger un autre prélèvement pour effectuer un deuxième Western-blot.

La PCR a permis d'éliminer le diagnostic de l'infection VIH chez 30 sujets supposés être positifs en Ac anti-VIH. Ceci, a permis d'éviter de lancer d'autres tests complémentaires et ainsi des coûts supplémentaires et surtout d'éviter de prolonger l'attente des résultats, qui peut avoir un impact psychologique sur le patient.

La PCR a aussi permis de confirmer la présence d'une infection VIH chez un seul patient. Ce test est d'un grand apport pour trancher, permet la prise en charge rapide de patients et évite leur perte de vue.

Au total, vu les résultats obtenus dans cette étude, nous pouvons recommander l'utilisation de la PCR pour trancher face aux profils indéterminé du Western-Blot. A défaut, la non disponibilité de la PCR au laboratoire, nous incite à exiger un deuxième prélèvement pour effectuer un autre western-Blot.



## CONCLUSION

---

L'affirmation d'une infection à VIH nécessite de disposer de résultats concordants des tests de dépistage.

L'interprétation des 31 profils indéterminés obtenus par le western blot reste délicate et nécessite de la rigueur pour poser le diagnostic.

La persistance d'un résultat indéterminé, surtout si les renseignements donnés indiquent une possible contamination, impose la nécessité de suivre le malade pendant plusieurs semaines, ce qui n'est pas toujours évident.

La PCR constitue une bonne alternative car elle permet un gain de temps important, donc moins de stress pour l'individu concerné.

Le résultat de ce présent travail, montre que le recours à la PCR pour interpréter les profils indéterminés, permet de confirmer la présence ou l'absence d'une infection à VIH (30 sérums négatif et un seul sérum positif). De ce fait, le délai du rendu de résultat sera court, la prise en charge sera immédiate et évitera la perte de vue des patients. Malheureusement, son cout élevé la rend inaccessible à tous les laboratoires.

Devant toutes ces constatations, la création d'un consensus visant à interpréter ces résultats le plus rapidement possible et à moindre coût est une très bonne alternative.

Les différentes études visant à interpréter ces profils indéterminés peuvent conduire à des résultats concluants. Vu la particularité de cette infection, la prudence est toujours demandée pour l'interprétation des résultats.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

### A

**AMRANE A.**, 2000 - Prise en charge thérapeutique de l'infection par le VIH /SIDA. *Le SIDA : revue bimestrielle de santé* n°2 pp 18-22.

**ARHEL N.**, **CHARNEAU P.**, 2009 - Devenir du génome VIH-1 : du transport intracellulaire jusqu'à l'intégration. *Virologie* n°13 pp 5-13.

**AUTORAN B.**, **CARCERLAIN G.**, **LI TS.**, **BLANC C.**, **MATHEZ D.**, **TUBIANA E.**, 1997 - Positive effects of combined anti-retroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* n° 277 pp 112-6.

### B

**BARIN F.**, **MAMMETTEA.**, 2002 – Rétroviridae : Les virus de l'immunodéficience humaine. *Virologie médicale* pp 569-94.

**BARRE-SINOUSSE F.**, **CHERMANN J.C.**, **REY F.**, 1983 - Isolation of a T-lymphotropicRetrovirusfrom a patient atrisk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* n° 220 pp 868-71.

**BARRE-SINOUSSE F.**, 2004 -Virologie fondamentale de l'infection VIH. *VIH* pp 3-9.

**BARRE-SINOUSSE F.**, 1996 - HIV as the cause of AIDS. *Lancet* n° 348 pp 31-35.

**BASCH M.**, **SATTERN G.A.**, 1997 - Time course of viremia and antibody seroconversion following humain immunodeficiency virus exposure. *Am.J.Med* n°102 pp 117-26.

**BOCKET L.**, **CIFASSIH**, **MAYO** Mayo Foundation for Medical Education and Research, 2009 - Session d'actualisation sur les A.E.V.

**BON I.**, **SCHAVONE P.**, **VITONE F.**, **GIBELLINI D.**, 2004 - Discordant resistance interprétation in multi-tread HIV-1 patients.*International journal of antimicrobienagents* n°25 pp 211-215.

**BRUN-VEZIN F.**, **WAINBERG M.**, **HURAUX J.M.**, **NICOLAS J.C.**, **AGUT H.**, **PEIGUE-LAFEUILLE H.**, 2003 - HIV : structure, multiplication et physiopathologie. *Traité de virologie* pp 319-329.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

### C

**CARCELAIN G., AUTRAM B., 2004** - Mécanismes immun pathologie de l'infection VIH. *VIH* n° 635 pp 21-38.

**CHARLEMAGNE J., 1989** - Le système immunitaire. Paris pp 404.

**CHARK E.A., 2000** - HIV dendritique cell ase embers for the infectious fire curn. *Annale de biologie Clinique* n° 58 pp 544-560

**CLAVEL F, GUETARD D, BRUN.VEZINET F and al., 1986** - Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* n° 4761vol 233 pp 343-346.

**COFFIN J.M., LEVY J.A., 1992** - Structure and classification of retroviruses. *éd .the retroviridaevol1* pp 19-50.

**CONNICK E., SCHLICHTEMEIER R.L., PURNER M.B., SCHNEIDER K.M., ANDERSON D.M., MAWHINNEY, CAMPBEL T.B., KURITZKES D.R., DOUGLAS J.R., JUDSON F.N., SCHOOLEY R.T., 2001** – Relationship between human immunodeficiency virus type 1(HIV1) specific memory cytotoxic T lymphocyte and virus load after recent HIV1 seroconversion. *J. infect. Dis.* n° 11 vol 184 pp 1465-1469.

**COUEE I., FONTAINE POITOU., GUILLAUME V., 2009** - Biologie et physiologie cellulaires et moléculaire. *Groupes de book université rue des minims* pp 398.

### D

**DE LEYS R., VANDERBORGHT B., VANDEN HAESEVELDE M., 1990** - Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin. *J Virol.* vol 64 pp 1207-1216.

**DELFRAISSY, 2004** - Prise en charge thérapeutique des personnes infectées par le VIH. *Paris: Flammarion médecine science* pp 231.

**DERCRION A.Z., DICHAMPI., VARIN A., HERBEIN G., 2005** - HIV and inflammation, *Curr HIV Res* vol 3 pp 243-259.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**DUFFY M.R., CHEN T.H., HANCOCK W.T., POWERS A.M., KOOL J.L., LANCIOTTI R.S., ZIKA,** 2009 - Virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med* vol 360 pp 2536-2543.

**DURIEZ M., NUGEYRE M.T., BARRE-SINOUSSE F., GIRARD P.M., KATLAMA C., PIALOU G.V.,** 2011 - Virologie fondamentale de l'infection VIH. *VIH édition Dion* pp 3-12.

### E

European aids clinical society, europeann association for the study of the liver, société de pathologie infectieuse de langue française, agence nationale de recherches sur le sida et les hépatites virales, european aids treatment group, international aids society et *al.*, 2005 - Première conférence européenne de consensus sur le traitement de l'hépatite chronique B et C chez des patients co-infectés par le VIH, et le VHC ou le VHB. 1-2. *Méd Mal Infect* vol 3 n°3 pp 109-20.

### F

**FIGRELLA J., CALAS A.,** 2012 - Précis de virologie humaine. *Edition Doin* pp 419.

### G

**GALLO R.,** 1987 - Les virus : de la grippe au SIDA. *Paris : pour la science* pp 160.

**GASTAUT J.L., et al.,** 2001 – VIH/SIDA et cancers. *Editions Ellipse*.

**GENETET N.,** 2002 – Immunologie. 4<sup>ème</sup> édition *Paris Lavoisier* pp 842.

**GEIJTENBEEK T.B., KWON D., TORENSMA R., and al.,** 2000 - DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1 binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*. n° 100 pp 587-597.

**GHAZI A., JAMJOOM PH D., MAATOUK J., GAZAL M., DAMANHOURI L., MBBS, AWLIAA A., RUWAIHI N., BAWAZEER M., HALABI H., ABUL ADEL A., ABDULLA A.,** 1997 - Follow-up of HIV western blot indeterminate results. *Annals of saudimedecin* n° 5 vol 17.

**GIRARD P.M., KATLAMA C.H., PIALAUX G.,** 2011 - VIH, *Paris* pp 839.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**GOFF** S.P., FIEDS B.N.,KINPE D.M., HOLEY P.M., 2007 - Retroviridae :the retroviruses and their replication .*Edi Fiends virology,5<sup>th</sup> edition Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers* pp 1999-2071.

**GOLDSBY** R.A., KINDTT. J., OSBORNE B. A., KUBYJ., FREEMANW.H., 2003 - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Immunology, 5<sup>ème</sup> edition*, pp 148-150.

**GORDON** S., PANDREA I., DUNHAM R., LEITNER T.,FOLEY B.,*et al.*, 2005 - The call of the wild :what can be learned from studies SIV infection of natural hosts. *Edi HIV sequence compendium Los Alamos :theoretical biology and biophysics Group, los Alamos national laboratory* , pp 2-29.

**GURTNER** L., MUHLBACHERA., MICHLU., HOFMANNH., PANGGIG., BOSSIV., THORSTENSSONR., VILLAESCUSAR.G., EIRASA., HERNANDEZ J.M., MELCHIORW., DONIEF., WEBERB., 1998 - Reduction of the diagnostic window with a new combined p24 antigen and human immunodeficiency Virus antibody screening assay. *J. Virol. Methods* n° 75 pp 27–38.

### H

**HOANG** P.H., GIRARD B., ROUSELIE F., GENTILINI M., 1989 - Oeil et SIDA. *Paris: Doin éditeur* pp 92.

**HURAUX** J.M., NICOLAS J.C., AGUT H., PEIGUE-LAFEUILLE H., 2003. *Traité de la virologie médicale. Agence universitaire de la francophonie* pp 689.

### I

**IRWIN** K. L, MOORMAN A. C., O'SULLIVAN M. J., SPERLING R., KOESTLER M. E., SOTO I, RICE R., BRODMAN M., YASIN S., DROESE A., ZHANG D., SCHWARTZ D. A., BYERS R. H., 2000 -Influence of human immunodeficiency virus infection on pelvic inflammatory disease. *Obstet Gynecol.* n° 955 vol 4 pp 25-34.

**IZOPET** J., 2007 - Originalité des inhibiteurs d'entrée. *Méd Mal Infect* n° 39 pp 1-4.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

### J

**JANIER M.**, 1989 - De la vénérologie aux maladies sexuellement transmissibles. *Ann dermato lveneréol* n° 116 pp 957-964.

**JANIER M.**, 2009 - Les maladies sexuellement transmissibles. *Paris* pp 220.

### K

**KALTAMA C.H.**, GHOSN J., 2004 - VIH et SIDA prise en charge et suivie du patient. pp 164.

**KAYSER F.H.**, BOTTGER E.C., ZINKERNAGE R.M., 2008 - Manuel de poche de microbiologie médicale. *Médecine-Sciences.Flammarion*.

**KORBER**, 1998 - Issu du livre Human retroviruses and AIDS, Numbering positions in HIV relative to HXB2CG pp 102.

### L

**LAPERCHE S.**, LY T.D., 2002 - Performance des tests de dépistage de l'infection par le VIH en 2001. *Laboratoire Claude –Lévy annales de biologie clinique* n°60 pp 307-15.

**LAPORTE A.**, LOT F., 2004 - Epidémiologie: situation actuelle et tendance. *VIH édition 2004 Paris: Doin éditeur* n°635 pp 39-51.

**LAZZAROTTO T.**, GALLI C., PULVIRENTI R., RESCALDANI R., VEZZO R., LA GIOIA A., MARTINELLI C., LA ROCCA S., AGRESTI G., GRILLNER L., NORDIN M., VAN RANST M., COMBS B., MAINE G. T., LANDINI M.P., 2001 - Evaluation of the Abbott AxSYM Cytomegalovirus (CMV) Immunoglobulin M (IgM) Assay in Conjunction with Other CMV IgM Tests and a CMV IgG Avidity Assay. *Clin Diagn Lab Immunol.* n° 1 vol 8 pp 196–198.

**LEBRETON M.**, YANG O., TAMOUFE U., 2007 - Exposure to wild primates among HIV-infected persons. *Emerg Infect Dis* n° 13 pp 1579-1582.

**LEVY J.A.**, 1998 - HIV and the pathogenesis of AIDS. 2<sup>ème</sup> édition *American society of microbiology, ASM Press*.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**LYDYARD P.**, WELAMA A., FANGER M., 2002 - L'essentiel en immunologie. Paris: Berti édition pp 1-384.

### M

**MC-CUTCHAN F.E.**, 2006 - Global epidemiology of HIV. *J. MED Virol*n°78suppl 1 pp 7-12.

**MINISTERE DE LA SANTE DE LA POPULATION ET DE LA REFORME HOSPITALIERE**, 2013 – Instruction n°06 fixant les directives nationales du diagnostic biologique de l'infection VIH.

**MINISTRY OF HEALTH, LABOUR, AND WELFARE OF JAPAN (2007) GUIDELINE FOR PREVENTION OF MOTHER-TO-CHILD TRANSMISSION OF HIV IN JAPAN** - 2010. *Clinical Chemistry* n° 10 vol 56 pp 1523-1526.

**MOTOMURA K.**, CHEN J., HU W., 2008 - Genetic recombination between HIV-1 and HIV-2, two distinct human Lentiviruses. *J. Virol.*n°82 vol 4 pp 1923-1933.

### N

**NIELSEN H.**, PEDERSEN F.S., KJEMS J., 2005 - Molecular strategies to inhibit HIV-1 replication. *Retrovirology* n° 2 vol 10.

### O

**ONUSIDA** global AIDS response progress reporting 2013: construction of core indicators for monitoring the 2011 UN Political Declaration on HIV/AIDS – ONUSIDA

### P

**PRESCOTT L.**, HARLEY J., KLEIN D., 2003 - Les maladies humaines dues aux virus. *Microbiologie* 2<sup>ème</sup> édition De boeck.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

### R

**RAFFI F.**, 1999 - Les rétrovirus actualité sur le VIH. pp 21.

**REVILLARD J.P.**, 2001 - Immunologie. *Espagne : de Beck université* pp 594.

**ROTH M., ISRAEL N., BARRE-SINOUSSE F.**, 2000 - Mécanismes de la réplication viral des HIV. *Medecine therapeutique* n°2 pp 12-18.

**ROZENBAUM W.**, 2001 - Traitement et prévention des infections opportunistes. *Impact. Paris : Edenter* pp 208.

**RUDOLF M., LEQUIN,** 2005 - Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry* n° 12 vol 51 pp 2415-2418

### S

**SALA M.**, 1999 - La transcriptase inverse du VIH-1 : structure et fonction. *Virology.* n°3 pp 9-15.

**SANHADJI K.**, 1994 - SIDA: un vaccin rapidement ou une solution alternative. *Remed* n° 03 pp 8.

**SEELAMGRI A., MADDUKURI A., BERRO R.**, 2004 - Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. *FRONT BIOSCI* n° 9 pp 2388-2413.

**SEMAILLE C., LOT F., GIRARD P.M., KATLAMA C., PIALOUX G.**, 2011 - Epidémiologie : situation actuelle et tendances. *VIH Doin* pp 49-60.

**SHANMUGAM V., SWITZER W.M., NKENGASONG J.N., GARCIA-LERMA G., GREEN T.A., EKPINI E., SASSAN-MAROKRO M., ANTUNES F., MANSHINO K., SORIANO V., WIKTOR S.Z., HENEINE W.**, 2000 - Lower HIV-2 plasma viral loads may explain differences between the natural histories of HIV-1 and HIV-2 infections. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* n°24 pp 257- 263.

**SIMON F., MAUCLERE P., ROQUES P.**, 1998 - Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med* n° 4 pp 1032-1037.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

### T

**TAHMINUR RAHMAN M., SALAH UDDIN M., SULTANA R., MOUE A., SETU M.,** 2013 - Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *AKMMC. J.* n° 1 vol 4 pp 30-36

**TEBOURSKI F., BEN ALAYA D.,** 2003 - Réactions des professionnels de la santé en Tunisie face aux personnes infectées par le VIH/SIDA. *Ethica Clinica.*

**THEZE J., DEBRE P.,** 2000 - L'infection à VIH : aspects physiopathologiques et génétiques. *Annales de l'Institut Pasteur* n° 11 vol 3 pp 3-12.

**TILTON J.C., DOMS R.W.,** 2010 - Entry inhibitors in the treatment of HIV-1 infection. *Antiviral Therapy* n°85 pp 91-100.

### V

**VALENDAR F., ELENI P.E., PAPANIMITRIOU J.M.,**1993 - Is a positive western blot proof of HIV infection ?.*Biotechnology* pp 11-31.

**VAN HEUVERSWYN F., Li Y., Bailes E.,** 2007 - Genetic diversity and phylogeographic clustering of SIVcpzPtt in wild chimpanzees in Cameroon. *Virology* vol 368 pp 155-171.

**VAUBOURDOULLE M.,** 2007. *Infectiologie 3ème édition, paris* pp 1036.

**VINAY S., MAHAJAN, CHRISTINE A., Petr-Jarolim,** 2010 - Interpretation of HIV Serologic Testing Results. *Clinical Chemistry* n° 10 vol 56 pp 1523-1526.

### W

**WEBER B., FALL E.H., BERGER A., DOER H.W.,** 1998 – Reduction of diagnosis window by fourth generation human immunodeficiency virus screening assays. *J.clin. microbial.* n°36 pp 2235-2239.



# ANNEXE 1

## APPAREILLAGE



Figure 28 : Centrifugeuse Jouan E82s    Figure 29 : Agitateur HEIDOLH POLYMAX 1040



Figure 30 : Micropipettes à volume fixe de 50µl,100µl,200µl



Figure 31 : Embouts à usage unique (bleus et jaunes)

## ANNEXE 1

---



**Figure 32 : Filtre membrane (0.45  $\mu\text{m}$ )**



**Figure 33 : Eprouvettes**



**Figure 34: Laveur manuelle à vide Millipore**



**Figure 35 : Incubateur à sec IPS.**



**Figure 36 : Laveur automatique PW 40**

## ANNEXE 1

---



Figure 37: Agitateur EV-102 tehtnica.



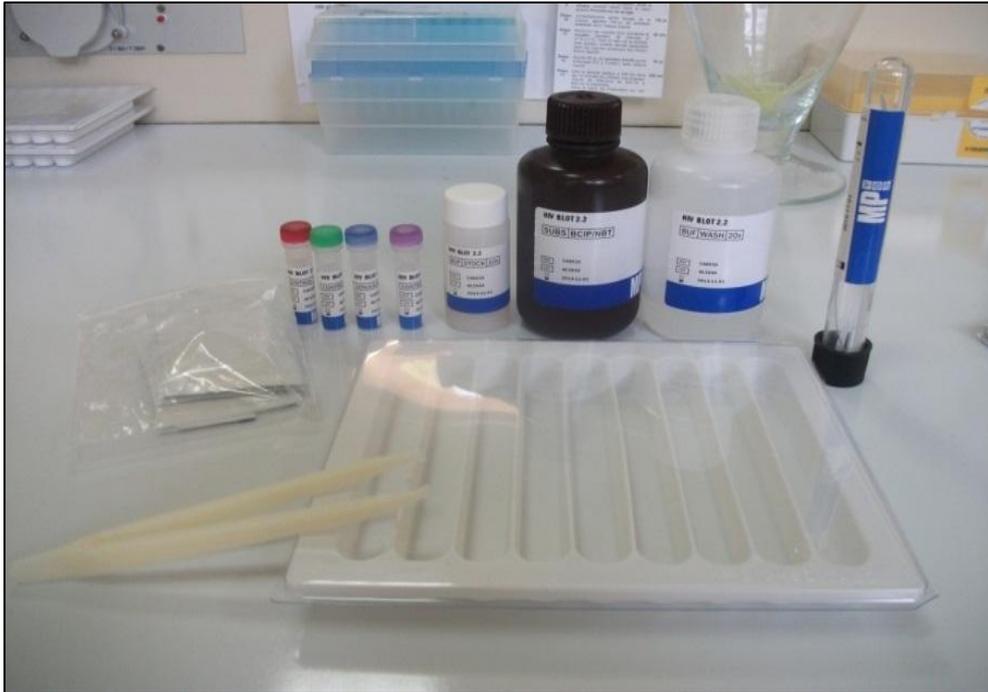
Figure 38 : Amplificateur COBAS TaqMan 48



Figure 39 : Trousse de test ELISA

## ANNEXE 1

---



**Figure 40 : Trousse de test WESTERN BLOT**



**Figure 41 : trousse de Test COBAS® AmpliPrep/ COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, version 2.0(PCR)**

## ANNEXE 2

---

**Tableau X : Composants de la trousse « Western blot »**

<b>Description</b>	<b>Quantité fournie</b>	
Bandelettes de nitrocellulose	18 ou 36 bandelettes	108 bandelettes
Contrôle non réactif	1 flacon (80µl)	3 flacons (80 µl)
Contrôle fortement réactif	1 flacon (80µl)	3 flacons (80µl)
Contrôle faiblement réactif	1 flacon (80µl)	3 flacons (80 µl)
Tampon de dilution concentré (10x)	1 flacon (20 ml)	3 flacons (20 ml)
Tampon de lavage concentré (20x)	1 flacon (70µl)	3 flacons (70µl)
Conjugate	1 flacon (120 µl)	3 flacons (120 µl)
Substrat	1 flacon (100 ml)	3 flacons (100 ml)
Poudre absorbante	10 sachets de 1g	30 sachets de 1g

## ANNEXE 2

Tableau XI : Composants de la trousse « Elisa »

Description	Quantité fournie	
	Plaque microtitre VIH	1 plaque 96 tests
Contrôle non réactif	1 ampoule	3 ampoules
Contrôle réactif aux antigènes	1 ampoule	3 ampoules
Contrôle réactif I	1 ampoule	3 ampoules
Contrôle réactif II	1 ampoule	3 ampoules
Concentré de lavage (20x)	1 flacon	2 flacons
Conjugué HRP	1 ampoule	5 ampoules
Conjugué de biotine	1 ampoule	5 ampoules
Solution chromogène A	1 ampoule	1 flacon
Solution chromogène B	1 ampoule	1 flacon
Solution d'arrêt	1 ampoule	1 flacon

## ANNEXE 2

Couvercles de plaques	2 couvercles	15 couvercles
Poche plastique scellable	1 poche	5 poches
Notice d'utilisation	1 exemplaire	1 exemplaire

**Tableau XII : Composants de la trousse « AxSYM »**

<b>Description</b>	<b>Quantité fournie</b>
Microparticules recouverte d'antigène VIH1/VIH2	1 flacon (6,8 ml)
Conjugué d'antigène anti-biotine	1 flacon (11,7 ml)
Antigène VIH1/VIH2	1 flacon (14,3ml)
Diluant pour échantillons	1 flacon (41,9ml)
AxSYM HIV1/2 gO index Calibrator	1 flacon (2,8 ml)
AxSYM HIV1/2 gO contrôles: contrôle négatif, contrôle positif VIH1, contrôle positif VIH2	3 flacons (8 ml)

## ANNEXE 2

AxSYM HIV1/2 gO contrôles: contrôle négatif, contrôle positif VIH1.	2 flacons (8 ml)
Solution de lavage des aiguilles AxSYM	2 flacons (220 ml)
Solution 1 (MUP)	4 flacons (230 ml)
Solution 3 (lavage pour matrice)	4 flacons (1000 ml)
Solution 4 (diluant)	1 bidon (10 L)

**Tableau XIII : Composants du kit « COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 »**

<b>Description</b>	<b>Constituants</b>
Cassette 1 : cassette de réactifs de particules de verre magnétique HIV1	1 x 48 tests
Cassette 2 : cassette de réactifs de lyse HIV1	1 x 48 tests
Cassette 3 : cassette de mutli-réactifs HIV1	- Solution de protéinase (Pase) : 1x 3,8 ml - Tampon d'élution (EB) : 1 x 7,0 ml

## ANNEXE 2

---

Cassette 4 : cassette de réactifs spécifiques au test HIV-1	-Standard de quantification de HIV1(QS) : 1 x 3,6 ml -Mélange réactionnel HIV1(MMX) : 1x2,5ml -Solution de manganèse CAP/CTM (CAP/CTM Mn <sup>2+</sup> ) : 1x19,8 ml
Contrôle fortement positif HIV1, v2.0	4 x 1,0 ml
Contrôle faiblement positif HIV1, v2.0	4 x 1,0 ml
Contrôle négatif (plasma humain)	4 x 1,0 ml
Réactif de lavage COBAS	1 x 5,1 L