



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE ET BIOLOGIE VEGETALE

N°...../SNV/2019

MÉMOIRE

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité:

GÉNÉTIQUE FONDAMENTALE ET APPLIQUÉE

*Thème réalisé au Laboratoire de L'INSTITUT PASTEUR D'ALGERIE et
L'EPH de SIDI ALI MOSTAGANEM*

THÈME

Les techniques de détection du VIH dans les échantillons humains

Présenté par

ACHIR Safia

YOUNSI Imane

DEVANT LE JURY

<i>Président :</i>	<i>Pr. CHIBANI. A.</i>	U. Mostaganem
<i>Encadrante :</i>	<i>Pr. DALACHE. F.</i>	U. Mostaganem
<i>Co-encadreur :</i>	<i>Dr. HENNOUS. M.</i>	U. Mostaganem
<i>Examineur :</i>	<i>Dr. ABBASSENE. F.</i>	U. Mostaganem

Soutenue publiquement le .11/07/2019

Remerciement

Tout d'abord, nous tenons à remercier le bon Dieu le tout Puissant de m'avoir donné la force et le courage

De mener à bien ce modeste travail, également nous remercions infiniment mes parents, qui nous encouragées et aidées à arriver à ce stade de ma formation. Nous tenons à remercier tous ceux et celle qui ont contribué à finaliser ce modeste travail. nos remerciements vont à Professeur Madame DALACHE Fatiha encadreur qui a bien voulu diriger a ce travail malgré ses nombreuses occupations. Son accueil chaleureux, ces conseils, ses suggestions pertinentes et ces critiques qui nous ont considérablement aidées et qui nous avoir guidées pour la réalisation de ce projet.

Nous remercions infiniment docteur HENNOUS Mohamed pour son suivi et son aide inestimable, ainsi que son soutien pour finir ce modeste travail. Sans oublier de cité Dr BELMAHFOUD Soumia et Dr CHEROUF abdelhak de l'institut PASTEUR d'Alger.

Nous adressons nos profonds remerciements aux membres de jury qui nous ont fais l'honneur d'examiner ce travail. nous remercions aussi toute personne qui a de près ou de loin contribué à l'accomplissement de ce travail.

Dédicace:

Je dédie ce modeste travail a mes chers parents qui ont contribué a mon éducation, a m'encouragé et à ma formation, a qui je leur doit tous .que dieu les préserve pour moi.

À ma chère sœur Wiam, et mes deux chers frères Mohamed et Aymen

À mes chères amies qui m'ont soutenue durant cette période.

Et à toute promotion Génétique fondamentale et appliquée.

Younsi imane

Je dédie ce travail A mes chers parents, pour leurs encouragement et soutien et leurs prières tout au long de mes études que dieu les protèges

A ma chère petite sœur: Doha

A tous mes amis, a tous ceux qui m'aiment et ceux que j'aime. Je leur remercie d'être toujours là pour moi.

Et à toute promotion Génétique fondamentale et appliquée.

Achir Safia

Résumé

Cette étude sur les différentes techniques directes et indirectes de diagnostic du VIH en Algérie a porté sur un échantillon de 38 personnes dont le sang a été analysé dans deux institutions médicales différentes. Au niveau de l'EPH le nombre d'individus était de 33 (p1-p32 sont des donneurs de sang, p33 est un patient hospitalisé) et Au niveau de l'IPA il s'agissait de 5 patients infectés par le VIH.

Au niveau de l'EPH, les tests rapides et tests ELISA combinés ADALTIS ont été effectué sur 33 échantillons de sang de 33 individus. Parmi l'ensemble des échantillons, un seul a montré un résultat positif mais pour lequel un test de confirmation a été effectué à l'IPA.

Au niveau de l'IPA, nous avons réalisé des analyses de détection d'une infection par le VIH par des tests rapides, tests ELISA WANTAI, tests ARCHITECT et WESTERN BLOT. Pour un dernier patient sous traitement anti-VIH, la PCR en temps réel a été effectuée afin d'évaluer la charge virale. Dans cette structure les résultats obtenus sont un patient avec un diagnostic positif et trois négatifs. Pour le patient dont la charge virale devait être mesurée, nous avons observé une hausse ce qui montre que le traitement préconisé est inadapté.

Mots clés: diagnostic VIH – ELISA – SIDA – Western blot – RT PCR – SIDA.

summary

This study on the different direct and indirect techniques of HIV diagnoses in Alegria focused on a sample of 38 people whose blood was analyzed in two different medical institutions. At the level of the EPH the number of individuals was 33 (p1-p32 are blood donors, p33 is a hospitalized patient) and at the level of the IPA there were 5 patients infected with HIV. At the EPH level, ADALTIS rapid tests and combined ELISA tests were performed on 33 blood samples from 33 individuals. Among all the samples, only one showed a positive result but for which a confirmatory test was carried out at the IPA. At the level of the IPA, we carried out tests for detection of an HIV infection by rapid tests, WANTAI ELISA tests, ARCHITECT tests and WESTERN BLOT tests. For a last patient on anti-HIV treatment, real-time PCR was performed to assess the viral load. In this structure the results obtained are a patient with a positive diagnosis and three negative. For the patient whose viral load was to be measured, we observed an increase which shows that the recommended treatment is inappropriate. Key words: HIV diagnosis - ELISA - AIDS - Western blot - RT PCR - AIDS.

ملخص

ركزت هذه الدراسة على مختلف التقنيات المباشرة وغير المباشرة لتشخيص فيروس نقص المناعة البشرية في الجزائر على عينة من 38 شخصًا تم تحليل دمهم في مؤسستين طبييتين مختلفتين .على مستوى المؤسسة العمومية الاستشفائية كان عدد الأفراد 33 (م-1م-32 من المتبرعين بالدم ، م33 هو مريض في المستشفى) وعلى مستوى معهد باستار بالعاصمة كان هناك 5 مرضى مصابين بفيروس نقص المناعة البشرية .على مستوى المؤسسة العمومية الاستشفائية ، أجريت اختبارات سريعة واختبارات ELISA recombined (adaltis) على 33 عينة دم من 33 فردًا .من بين جميع العينات ، أظهرت واحدة فقط نتيجة إيجابية والتي من أجلها تم إجراء اختبار تأكدي في معهد باستار بالجزائر .

على مستوى معهد باستار ، أجرينا اختبارات للكشف عن الإصابة بفيروس نقص المناعة البشرية عن طريق الاختبارات السريعة ، اختبارات WANTAI ELISA ، اختبارات architect ، اختبارات Western BLOT. لآخر مريض تحت علاج مضاد للفيروس، تم إجراء PCR في الوقت الحقيقي لتقييم الحمل الفيروسي .في هذا الهيكل ، تكون النتائج التي تم الحصول عليها مريضًا مصابًا بتشخيص إيجابي وثلاثة سلبية .بالنسبة للمريض الذي كان يجب قياس حملها الفيروسي، لاحظنا زيادة توضح أن العلاج الموصى به غير مناسب .

الكلمات المفتاحية: تشخيص فيروس نقص المناعة البشرية - ELISA - الإيدز - لطفة غربية - RT PCR - الإيد

Liste des Abréviations

- ADN : Acide Désoxy Ribonucléique
- AES : Accident d'Exposition au Sang et/ou liquide biologique
- ARN : Acide Ribonucléique
- CD4 : Cellule de Différentiation
- CRF : Circulating Recombinant Form
- EIA : Enzymo-Immuno-Assay
- ELISA : Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
- env : enveloppe
- gag : groupe antigène
- LNR : Laboratoire National de Référence
- OMS : Organisation Mondiale de la Santé
- ONUSIDA : Organisation des Nations Unies sur le VIH/SIDA
- PCR : Polymeras Chain Reaction
- Pol : Polymérase
- RT : Reverse Transcriptase
- SIDA : Syndrome d'Immunodéficience Acquis
- UDI: utilisateurs de drogues par voie injectable
- VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

Liste des figures

Figure1: la diversité génétique.....	(5)
Figure2: structure du VIH	(7)
Figure3: organisation de génome du VIH	(9)
Figure4: étape du cycle de réplication.....	(11)
Figure5: changement de conformation au cours de l'entrée du VIH dans les cellules cibles.....	(12)
Figure6: transcription inverse de l'ARN viral	(14)
Figure7: intégration de l'ADN proviral	(15)
Figure8: rôle de la protéine TAT.....	(16)
Figure9: Transport des ARN messagers et de l'ARN génomique	(17)
Figure10: la structure des ARNm du HIV-1	(18)
Figure11: mécanisme de décalage de phase en-1	(19)
Figure12: maturation du virion du VIH par la protéase	(20)
Figure 13: bourgeonnement et maturation	(20)
Figure 14: Evolution des marqueurs biologiques	(24)
Figure 15: test combiné antigène-anticorps	(27)
Figure 16: test de confirmation	(28)
Figure 17: les échantillons	(38)
Figure 18: les bandelettes	(38)
Figure 19: le kit ADALTIS.....	(39)
Figure 20: microplaque ADALTIS.....	(39)
Figure 21: le kit WANTAI.....	(42)
Figure 22: microplaque WANTAI.....	(42)
Figure 23: test ARCHITECT	(44)
Figure 24: le portoir avec les échantillons.....	(44)

Figure 25: le plateau à bascule	(45)
Figure 26: les contrôles et les échantillons	(45)
Figure 27: les puits	(46)
Figure 28: bandelette témoin	(47)
Figure 29: thermocycleur pour PCR-en temps réel	(48)
Figure 30: ordinateur avec logiciel AMPLILINK	(48)
Figure 31: les cassettes sur les portoirs	(48)
Figure 32: automate d'extraction d'acides nucléiques COBAS Ampliprep	(49)
Figure 33: les tubes Ket S	(49)
Figure 34: SPU	(49)
Figure 35: proportion des patines selon le sexe	(54)
Figure 36: proportion des patines selon l'âge	(55)
Figure 37: principe de test rapide	(56)
Figure 38: Aspect des résultats du test rapide	(56)
Figure 39: principe de test ELISA ADALTIS	(58)
Figure 40: principe de test ELISA WANTAI	(61)
Figure 41: principe de test ARCHITECT	(63)
Figure 42: principe de test WESTERN BLOT	(66)
Figure 43: résultat du test WESTERN BLOT	(66)
Figure 44: principe de la RT-PCR	(72)

Liste des tableaux

Tableau 1: les gènes de HIV 1 et HIV 2 et leurs protéines correspondant.....	(27)
Tableau 2: critères d'interprétation de western blot selon l'OMS.....	(28)
Tableau 3: disposition des échantillons du test ADALTIS HIV1+2 Ag/Ab.....	(41)
Tableau 4: descriptif de la réalisation du test WANTAI.....	(43)
Tableau 5: descriptif de la réalisation du test WESTERN BLOT	(47)
Tableau 6: représentation des résultats du test ADALTIS	(60)
Tableau 7: résultat du test ELLISA WANTAI	(72)
Tableau 8: résultat du test ELLISA ARCHITECT.....	(64)
Tableau 9: récapitulatif des résultats des tests de détection de l'infection au VIH.....	(65)
Tableau 10: résultats du test de l'évaluation de la charge virale.....	(68)

sommaire

Introduction	(2)
1 revue biobibliographie	
1.1 Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)	(4)
1.1.1 Historique du VIH	(4)
1.1.2 Classification et nomenclature de VIH	(4)
1.1.3 Diversité génétique	(5)
1.1.4 Structure du VIH.....	(6)
1.1.4.1 Morphologie	(6)
1.1.4.2 L'enveloppe	(6)
1.1.4.3 Matrice et capsid	(6)
1.1.5 Le génome viral	(7)
1.1.6 Les protéines de la structure	(8)
1.1.6.1 Les protéines de l'enveloppe virale	(8)
1.1.6.2 Les protéines de la matrice	(8)
1.1.6.3 Les protéines de la capsid	(8)
1.1.7 Les protéines de régulation	(9)
1.1.7.1 Activateur de transcription (Tat)	(9)
1.1.7.2 Protéine Régulatrice des gènes Viraux (Rev).....	(9)
1.1.7.3 Facteurs Négatifs (Nef).....	(9)
1.1.7.4 Facteur d'Infectivité Virale (Vif).....	(9)
1.1.7.5 Protéine Virale R (Vpr)	(9)

1.1.7.6 Protéine Virale U.....	(10)
1.1.8 Les Cellules cibles du VIH.....	(10)
1.1.8.1 Cellules dendritiques	(10)
1.1.8.2 Cellules de la lignée monocyttaire	(10)
1.1.8.3 Lymphocytes CD4+.....	(11)
1.1.9 Cycle viral	(11)
1.1.9.1 Entrée du virus.....	(12)
1.1.9.2 Transcription inverse	(13)
1.1.9.2.1 Formation du petit brin négatif d'ADN « strong stop DNA.....	(13)
1.1.9.2.2 Synthèse du long brin négatif d'ADN.....	(13)
1.1.9.2.3 Initiation de la synthèse du brin positif d'ADN.....	(14)
1.1.9.3 Intégration de l'ADN proviral.....	(14)
1.1.9.4 la transcription.....	(15)
1.1.9.5 l'Epissage des ARN pré-messagers	(16)
1.1.9.6 Transport des ARN messagers et de l'ARN génomique	(17)
1.1.9.7 La traduction	(17)
1.1.9.8 Bourgeonnement et maturation du virion.....	(19)
1.2 Épidémiologie.....	(21)
1.2.1 Situation épidémiologique du sida dans le monde et en Algérie	(21)
1.2.1.1 Dans le monde.....	(21)
1.2.1.2 En Algérie.....	(21)
1.2.2 Mode de transmission du VIH.....	(22)
1.2.2.1 la transmission par voie sexuelle.....	(22)

1.2.2.2 La transmission par voie sanguine.....	(22)
1.2.2.3 La transmission mère enfant.....	(23)
1.3. Diagnostic virologique.....	(24)
1.3.1 Marqueurs biologiques et leur évolution.....	(24)
1.3.1.1 La primo-infection.....	(24)
1.3.1.2 La phase asymptomatique: phase de latence.....	(25)
1.3.1.3 La phase symptomatique ou phase SIDA.....	(25)
1.3.2 Diagnostic sérologique: Diagnostic indirect.....	(25)
1.3.2.1 Tests de dépistage.....	(25)
1.3.2.1.1 Tests simples/rapides.....	(25)
1.3.2.1.2 Tests immuno-enzymatiques	(26)
1.3.2.2 Tests de confirmation	(27)
1.3.3 Diagnostic direct:	(28)
1.3.3.1 Test de détection de l'antigène p24.....	(28)
1.3.3.2 Test de l'isolement	(29)
1.3.3.3 Technique de biologie moléculaire.....	(29)
1.3.4 Dépistage de l'infection à VIH.....	(29)
1.3.4.1 Algorithme 1: Dépistage de l'infection à VIH dans un Centre de dépistage (CD).....	(30)
1.3.4.2 Algorithme 2: Diagnostic sérologique de l'infection due au VIH chez l'adulte et l'enfant âgé de plus de 18 moi.....	(30)
1.4 Traitement.....	(33)
1.4.1 Traitement anti-VIH: trithérapie.....	(33)
1.4.2 Traitement Post Exposition (TPE).....	(34)

1.4.3 La résistance aux médicaments.....	(34)
2. Matériels et méthodes	(37)
2.1 Présentation des structures de stage.....	(37)
2.2 Test rapide.....	(37)
2.2.2 Méthode du test rapide	(38)
2.3 ELISA combiné Ag/AC (4ème génération).....	(38)
2.3.1 ADALTIS VIH 1+2 Ag/AC.....	(39)
2.3.1.1 Matériels utilisés pour ADALTIS	(40)
2.3.1.2 Méthode du test ADALTIS	(40)
2.3.2 ELISA combinée WANTAI HIV 1+2 Ag.....	(42)
2.3.2.1 Matériel utilisé pour WANTAI	(43)
2.3.2.2 Méthode du test WANTAI.....	(44)
2.4 ARCHITECT.....	(44)
2.4.1 Matériels utilisés pour CMIA ARCHITECT	(44)
2.4.2 Méthode du CMIA ARCHITECT.....	(44)
2.5 Le test WESTERN BLOT.....	(45)
2.5.1 Matériels utilisés pour WESTERN BLOT	(45)
2.5.2 Méthode du test WESTERN BLOT	(46)
2.6 Evaluation de la charge virale par la PCR en temps réel HIV-1.....	(47)
2.6.1 Matériel utilisé pour évaluation de la charge virale	(47)
2.6.2 Méthodes d'évaluation de la charge virale	(50)
2.6.2.1 Extraction d'ADN.....	(50)
2.6.2.2. PCR en temps réel.....	(51)

3. Résultats et discussion.....	(54)
3.1 Présentation de l'échantillon des patients de l'EPH.....	(54)
3.1.1. Selon le sexe.....	(54)
3.1.2 Présentation de l'échantillon Selon l'âge.....	(55)
3.2 Détection du VIH par Test rapide.....	(55)
3.3.3 ARCHITECT.....	(63)
3.3.4 Détection de l'infection au VIH par WESTEREN BLOT.....	(65)
3.3.5 Evaluation de la charge virale par la PCR en temps réel.....	(71)
4 conclusions	(75)
5 références bibliographie	(78)

Introduction générale

Plus de trois décennies après sa première mise en évidence médicale, le Syndrome d'Immunodéficience Acquis ou SIDA s'est révélé être une des maladies les plus dévastatrices de toute l'histoire de l'humanité.

L'infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) est une infection rétrovirale chronique, persistante, acquise par voie sexuelle, sanguine ou par transmission de la mère à l'enfant (**Leghmari, 2008**). Dans le monde, en 2017 le nombre de personnes vivant avec le VIH est estimé à 36.9 millions. Depuis 2010, les nouvelles infections par le VIH chez les adultes ont diminué d'environ 16 %, passant de 1.9 millions à 1.6 millions en 2017. Les nouvelles infections par le VIH chez les enfants, quant à elles, ont diminué de 35 % depuis 2010, passant de 270 000 en 2010 à 180 000 en 2017. Dans l'ensemble, les décès liés au SIDA ont diminué de 51 % depuis 2004.

En 2017, un total de 940 000 personnes sont mortes des suites des maladies liées au SIDA dans le monde, contre 1.4 millions en 2010. En Algérie, le rapport du Laboratoire National de Référence du VIH/SIDA de l'Institut Pasteur Algérie fait état d'un total cumulé depuis 1985 (1er cas diagnostiqué) au 30/09/2018, de 12 083 cas dont 1 885 cas au stade de SIDA et 10 198 cas de séropositifs et d'un nombre de 700 à 900 nouveaux cas d'infections à VIH diagnostiqués par an, au cours de ces 5 dernières années.

La gravité de cette maladie et l'absence de vaccin ont entraîné la mise au point de plusieurs méthodes de diagnostic qui se basent sur le matériel viral ou les anticorps anti-VIH développés chez les patients et ceci dans le but de faire un diagnostic le plus précoce possible. En effet le diagnostic de l'infection par le VIH est fondé sur une méthode sérologique indirecte, c'est-à-dire sur la détection des anticorps, et reste, dans la majorité des cas, l'approche diagnostique la plus pertinente et la plus accessible. Il s'agit le plus souvent de la méthode ELISA pour le dépistage et du Western blot pour la confirmation.

Chez l'enfant né de mère séropositive, les anticorps maternels transmis persistent au-delà de 12 mois, ceci rend donc le diagnostic sérologique d'une éventuelle infection chez l'enfant ininterprétable avant 18 mois. Le diagnostic direct, par la détection du virus ou de ses constituants (Antigène p24, ARN génomique, ADN proviral) est plus sûr dans ces conditions. La PCR en temps réel est une technique de biologie moléculaire qui

Introduction

consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle grâce à un marqueur fluorescent. Elle permet par son principe de faire des mesures quantitatives qui permettent d'évaluer l'efficacité des traitements (**Razina, 2008**).

Le but, de notre travail, était de prendre connaissance de l'algorithme adopté dans le secteur médical algérien pour la détection des infections par le VIH. Dans ce cadre, différentes méthodes ont été utilisées :

- ☞ Méthodes indirectes, par détection des anticorps par la technique ELISA.
- ☞ Méthodes directes par détection des protéines du VIH par le WESTERN-BLOT.
- ☞ Méthodes directes, par détection du génome du VIH et l'évaluation de son titre, par la RT-PCR.

1. Revue bibliographique

1.1. Le virus de l'immunodéficience humaine: VIH

1.1.1 Historique de la découverte du VIH

Le syndrome de l'Immunodéficience Acquis (SIDA) a été décrit en 1981, devant un tableau clinique inhabituel qui était observé chez des jeunes homosexuels américains (Center for Disease Control 1981), il était caractérisé par une atteinte du système lymphatique avec une survenue d'infections opportunistes associées à une immunodéficience sévère. La description d'autres cas dans la communauté homosexuelle et Par milliers d'utilisateurs de drogues par voie injectable (UDI) aboutit à individualiser ce nouveau syndrome: le SIDA. L'agent étiologique fut isolé pour la première fois en 1983 à l'institut Pasteur, dans la même année aux Etats-Unis, l'équipe du professeur Gallo, isolait le même virus et le dénommait HTLV-III (Human T Lymphotropic Virus type III). En 1985, des réactions sérologiques atypiques étaient mises en évidence avec des sérums de travailleuses du sexe du Sénégal. Ces observations démontraient l'existence d'un autre virus humain plus proche d'un rétrovirus simien. Ce virus a été isolé en 1986 et désigné LAV-2. En 1986, une révision taxonomique harmonisa les différentes dénominations et définit les VIH ou HIV (Human Immuno-Deficiency Virus) de type 1 et de type 2 comme agents responsables du SIDA (Sontie, 2010).

1.1.2 Classification et nomenclature de VIH:

Le VIH-1 est un rétrovirus appartenant à la famille des Retroviridae appartenant au genre Lentivirus. D'après ICTV (l'International Committee on Taxonomy of Viruses), on distinguera 7 genres de rétrovirus selon divers critères tels que la pathogénicité, la morphologie et la structure du génome.

Les 7 genres qui constituent les rétrovirus sont les suivants:

- les Alpharétrovirus (ALV : Avian Leukosis Virus)
- les Betarétrovirus (MMTV: Mouse Mammary Tumor Virus)
- les Gammarétrovirus (MLV : Murine Leukemia Virus) Des rétrovirus complexes codants en plus des protéines Gag, Pol, Env possèdent dans leur génome des séquences codantes pour des protéines régulatrices :
- les Deltarétrovirus (HTLV : Human T-Lymphotropic Virus)

- les Epsilonrétrovirus (WDSV : WalleyeDermalSarcoma Virus)
- les Spumavirus (HFV : HumanFoamy Virus)
- les Lentivirus (HIV : HumanImmunodeficiency Virus) sont des virus responsables d'infections virales à développement lent(Matysiak, 2016).

1.1.3 Diversité génétique

Le VIH est un virus qui existe en deux types: Le VIH-1 majoritaire et dont la variabilité est très élevée et le type VIH-2 endémique et présentant 50 % d'homologie avec le VIH-1 au niveau des gènes gag et pol et apparaît comme moins infectieux.

Le virus du type VIH-1 se subdivise en plusieurs groupes dont le groupe majoritaire dénommé M (Majeur), le groupe outlier dénommé O, les très rares variants des groupes N (New ou Non M, Non O) et un quatrième groupe appelé P (putative). C'est le VIH-1 du groupe M qui est responsable de la pandémie de SIDA. À l'intérieur du groupe M, il existe 9 sous-types (de A à D, F à H et J à K) dont le sous-type majoritaire est le sous-type C qui représente près de 50 % des infections dans le monde. Il existe également des variations au sein des sous-types tels que le sous-type F qui peut être divisé en F1 et F2 et le sous-type A en A1, A2, A3 et A4. Ils s'ajoutent ensuite les CRF (circulating recombinant form) issues de mélanges dans le génome viral entre plusieurs sous-types lors de co-infections(figure 1) (Matysiak, 2016).

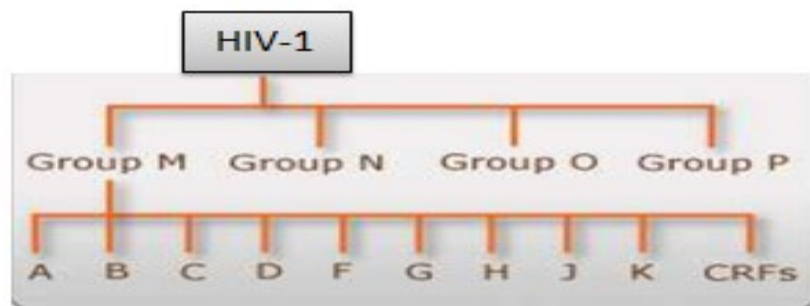


Figure 1: Diversité génétique(Matysiak, 2016).

1.1.4 Structure du VIH:

1.1.4.1 Morphologie

Les VIH-1 et VIH-2 se présentent sous forme de particules sphériques de 80-120nm de diamètre. En microscopie électronique VIH-1 et VIH-2 présentent une morphologie similaire. Ces particules sont constituées de 4 éléments: le génome, la capsid, la matrice et l'enveloppe. Les virus possèdent une enveloppe externe surmontée de spicules qui entourent un noyau central ou excentré contenant la nucléocapsid. Les particules virales sont libérées de la cellule dans laquelle elles se répliquent par un processus de bourgeonnement.

1.1.4.2 L'enveloppe

L'enveloppe virale entourant la nucléocapsid est formée d'une double couche lipidique d'origine cellulaire et de deux glycoprotéines virales la glycoprotéine transmembranaire TMgp 41 qui traverse la double couche lipidique et est liée par des liaisons faibles à la glycoprotéine d'enveloppe externe (SUgp 120).

L'ensemble faisant saillie à la surface du virus sous forme de spicules qui correspondent à des trimères de ces deux glycoprotéines. Ces glycoprotéines d'enveloppe proviennent du clivage d'un précurseur gp160 pour le VIH-1. Elles sont antigéniques et jouent un rôle important dans la fixation et la pénétration des VIH dans la cellule cible. (Sontie, 2010).

1.1.4.3 Matrice et capsid

La matrice est la couche tapissant l'enveloppe, elle est disposée de manière régulière isométriquement et accède de ce fait à la surface du virion. Elle mesure 5-6 nm d'épaisseur et joue le rôle de facteur stabilisant de la particule virale mature et servirait d'échafaudage supportant les projections de surface voire de «pont» entre nucléocapsid et glycoprotéines d'enveloppe.

Elle est constituée d'une protéine de matrice (p17MA) et est associée à la troisième enzyme virale ou protéase. La capsid encore appelée nucléoïde comprend deux molécules d'ARN identiques, trois protéines et des enzymes virales: la transcriptase inverse ou retro transcriptase, l'intégrase et la protéase. La capsid virale est constituée de la protéine interne dite majeure, car elle est la plus abondante, d'un poids moléculaire de 24 KDa nommée aussi la p24 CA. La protéine de nucléocapsid (p7NC) est associée aux molécules d'ARN (Figure 2) (Sontie, 2010).

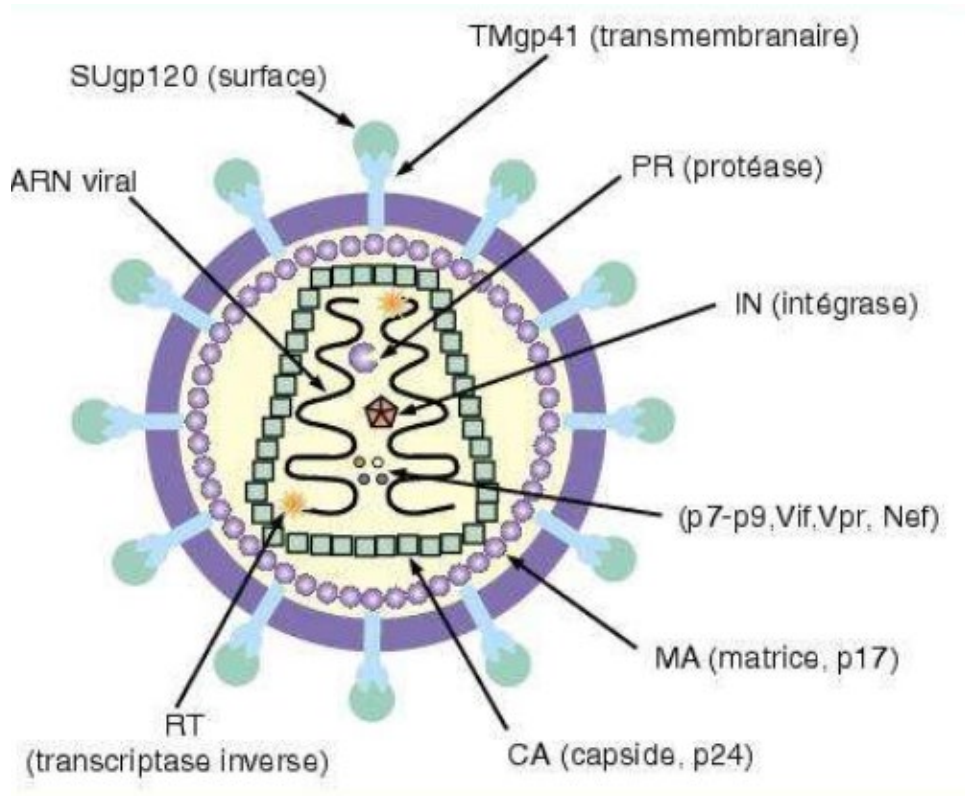


Figure 2: structure du VIH(Sontie, 2010).

1.1.5 Le génome viral

Le génome est constitué de deux molécules d'ARN comportant chacune environ 10.000 nucléotides. Le génome du VIH code pour un total de trois protéines structurales, deux protéines d'enveloppe, trois enzymes et six protéines accessoires (Tableau 1) (figure3)(Leghmari, 2008).

Tableau 1: les gènes de VIH-1 et VIH-2 et leurs protéines correspondantes

Les gènes	VIH-1	VIH-2
antigène de groupe (Gag)	P15, P17, P24	P12, P26, P16
polymérase (Pol)	P66, P31, P21	P68, P34, P21
enveloppe (Env)	P120, P41	P125, P36
Les gènes supplémentaires	Tat, rev, nef vif ; vpr ; vpu	Tat, rev, nef vif ; vpr ; vpu, vpx

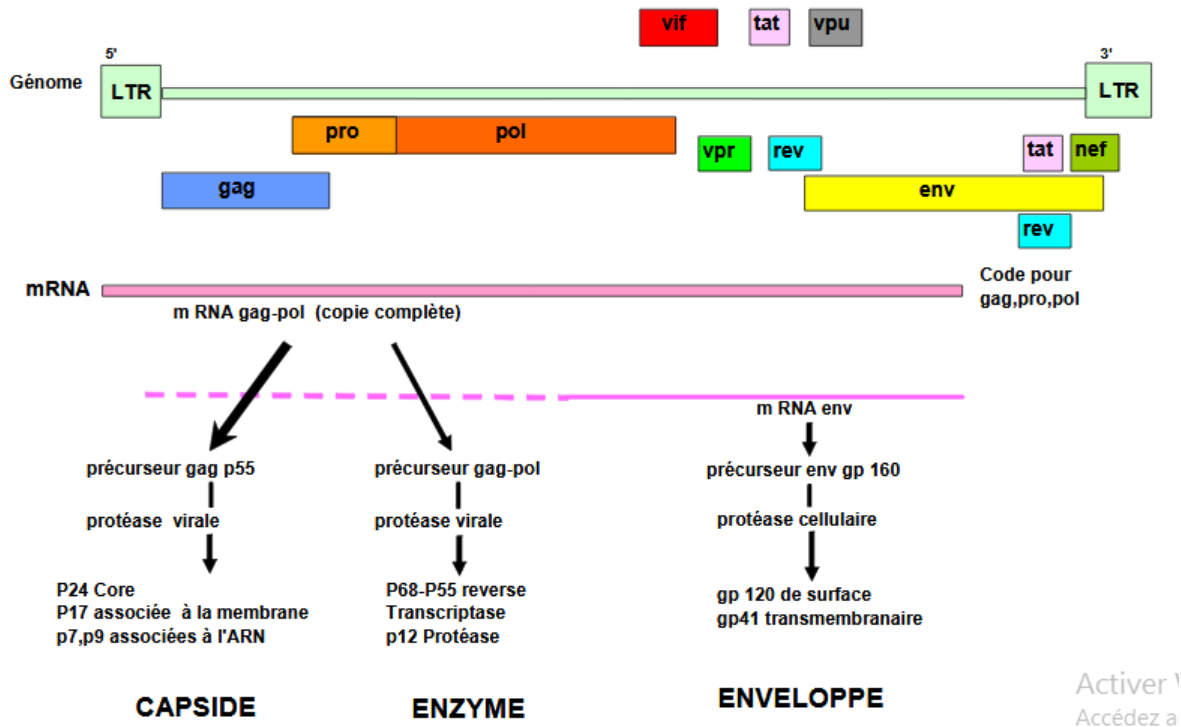


Figure 3: Organisation du génome du VIH(Leghmari, 2008).

1.1.6 Les protéines de la structure

1.1.6.1 Les protéines de l'enveloppe virale

Les protéines de l'enveloppe virale sont synthétisées sous forme d'un précurseur de 160 kDa (gp160), qui est ensuite mûré par une endoprotéase, pour donner les glycoprotéines gp120 et gp 41. Ces molécules s'associent par des liaisons non covalentes et forment un complexe à la surface de la particule virale et des cellules.

La gp120 en se liant aux cellules hôtes via les récepteurs membranaires CD4et CXCR4 ou CCR5 joue un rôle indispensable dans la pénétration du virus (Leghmari, 2008).

1.1.6.2 Les protéines de la matrice

Les protéines de la matriceMA (17 kDa), produits de maturation du précurseur Gag, tapissent l'intérieur de l'enveloppe virale en interagissant avec la membrane lipidique interne.

1.1.6.3 Les protéines de la capsid

Les protéines de la capsid CA (24 kDa) sont les produits de maturation de Gag, les CA du VIH-1 forment la capsid du virus mature qui lui confère une structure conique(Leghmari, 2008).

1.1.7 Les protéines de régulation

1.1.7.1 Activateur de transcription(Tat)

La protéine Tat(14 kDa) permet une élongation efficace de la transcription du génome viral.elle est exprimée précocement dans la cellule, elle peut être aussi associée à la particule virale. (**Leghmari, 2008**).Tat se fixe sur une séquence structurée située dans la région 5' UTR de l'ARN génomique, l'élément TAR (Transactivation-responsive Region), et recrute un ensemble de facteurs de transcription cellulaires (**Vitte, 2006**).

1.1.7.2 Protéine Régulatrice des gènes Viraux(Rev)

La protéine REV est une phosphoprotéine qui reconnaît spécifiquement un élément présent sur tous les ARNm viraux non complètement épissés, le RRE (Rev-Responsive Elément), et utilise les systèmes de transport cellulaires pour les exporter vers le cytoplasme(**Vitte, 2006**).

1.1.7.3 Facteurs Négatifs (Nef)

La protéine Nefest un facteur aux effets multiples sur la réplication virale.Celle des VIH joue un rôle essentiel in vivo dans la physiopathologie de l'infection et l'induction du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) par la diminution le nombre des cellules hôte.

Cette protéinemodule l'expression des récepteurs à la surface des cellules infectées, et en particulier le récepteur CD4 et les molécules du CMH de classe I (Complexe Majeur d'Histocompatibilité), essentiels à la réponse immunitaire(**Vitte, 2006**).

1.1.7.4 Facteur d'Infectivité Virale (Vif)

Le facteur Vif est fortement exprimé lors de la phase tardive du cycle viral. La protéine Vif est présente dans presque tous les lentivirus. Ilest indispensable à la multiplication virale in vivo chez l'hôte infecté (**Vitte, 2006**).

1.1.7.5 Protéine Virale (Vpr)

La protéine Vpr participe à l'import du complexe de pré-intégration dans le noyau. Elle interfère avec la progression du cycle cellulaire, en induisant l'arrêt rapide des cellules en phase G2/M. Vprpossède une séquence d'export nucléaire (Nuclear Export Sequence, NES), qui lui permettrait d'être incorporée dans les nouveaux virions.

1.1.7.6 Protéine Virale (Vpu)

La protéine Vp est une petite protéine membranaire qui stimule la libération des nouveaux virions.

1.1.8 Les Cellules cibles du VIH

La réponse immunitaire peut être schématiquement divisée en trois phases :

- La présentation de l'antigène, initialement capturé par des cellules présentatrices de l'antigène.
- La reconnaissance spécifique de cet antigène par les lymphocytes T, ce qui conduit à l'initiation puis à l'amplification de la réponse immunitaire spécifique.
- La phase effectrice qui aboutit à l'élimination de cet antigène. Chez l'homme, la plupart des différentes cellules participant à ces trois phases de la réponse immunitaire expriment la molécule CD4 et sont les cibles de l'infection par le VIH.

1.1.8.1 Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont originaires de la moelle osseuse et pourraient partager un précurseur commun avec les cellules de la lignée monocyttaire.

Ces cellules sont présentes dans le thymus, la peau (cellules de Langerhans) les muqueuses ainsi que dans tous les organes lymphoïdes secondaires.

Ces cellules ont un rôle majeur lors de la reconnaissance de l'antigène au cours d'une réponse immune primaire. Chez l'homme, les cellules dendritiques expriment la molécule CD4. Il a été montré qu'elles sont fréquemment infectées par le VIH in vivo. De plus, il semble que la réplication du VIH dans ces cellules soit particulièrement efficace.

1.1.8.2 Cellules de la lignée monocyttaire

Chez l'homme, les cellules de la lignée monocyttaire expriment la molécule CD4. Ces cellules sont présentes dans le sang circulant sous la forme de monocytes, et dans tous les tissus sous forme de macrophage tissulaire. Elles sont également chargées de la capture et de la dégradation de l'antigène, puis de sa présentation aux lymphocytes T. tous les macrophages tissulaires peuvent être infectés par le VIH in vivo et pourraient être ainsi une source de réplication virale locale. Dans le cerveau par exemple, les cellules microgliales d'origine monocyttaire représentent la principale population cellulaire infectée par le VIH. Ces cellules

Jouent certainement un rôle important dans les pathologies neurologiques associées à l'infection par le VIH.

1.1.8.3 Lymphocytes CD4+

Parmi les lymphocytes T du sang périphérique. Il existe deux populations mutuellement exclusives, l'une exprimant la molécule CD4. L'autre la molécule CD8. La plupart des cellules CD8+ sont des lymphocytes cytotoxiques, tandis que la plupart des lymphocytes CD4+ sécrètent les lymphokines. Ces lymphokines ont un rôle fondamental dans la régulation de la réponse immunitaire, en particulier l'interleukine-2 qui permet la prolifération des lymphocytes T. Certaines lymphokines participent également à la phase effectrice de la réponse immunitaire par leurs propriétés chimiotactiques ou d'activation cellulaire.

1.1.9 Cycle viral

Les principales étapes du cycle viral de VIH-1: entrées du virus, intégration, cycle productif sont décrites dans la figure 4.

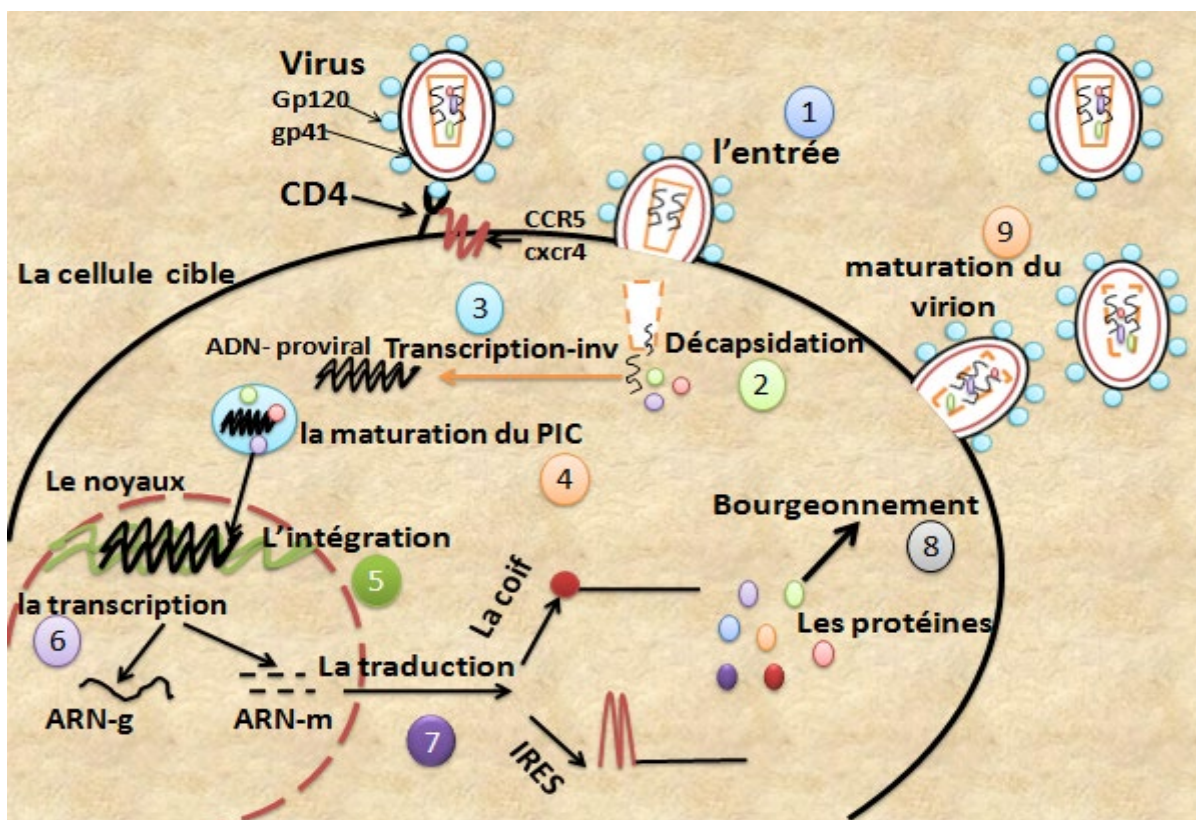


Figure 4: Etapes du cycle de réplication du VIH

1.1.9.1 Entrée du virus

L'entrée du virus dans la cellule commence par la liaison de la glycoprotéine gp 120 du virus à son récepteur spécifique, la molécule CD4. Cette liaison de très haute affinité entraîne un changement conformationnel découvrant les sites d'interaction aux corécepteurs référence qui permet à la gp120 de se lier au corécepteur (CCR5 ou CXCR4) à la surface de la membrane cellulaire. Cette interaction entre gp 120 et corécepteurs met en contact le gp 41 du Virus qui contient un peptide de fusion entre l'enveloppe virale et la membrane de la cellule hôte.

La gp41 change de conformation, conduisant à l'accessibilité de la région N-terminale hydrophobe, qui correspond au domaine de fusion. Cette région s'insère alors dans la membrane de la cellule hôte. Commence alors un phénomène dynamique médié par l'interaction entre les trimères HR1 (ou N36) et HR2 (ou C34), formant une structure en épingle à cheveux. Grâce à l'interaction entre les domaines N et C-terminaux de la gp41, une structure à 6 hélices se forme et permet de rapprocher les membranes virale et cellulaire qui fusionnent. Toutefois, le contact des virions avec les lymphocytes T CD4+ provoque, de façon simultanée l'endocytose des particules virales. Seule l'entrée par fusion des virions semble mener à une infection productive dans les lymphocytes T CD4+. L'entrée des virions par endocytose semble une voie sans issue qui conduit à leur dégradation. Cependant, une étude récente a montré que les virus qui rentrent par endocytose ne sont pas nécessairement dégradés et que cette voie d'entrée pourrait aussi contribuer à la dissémination du virus *in vivo* (figure 5)(Leghmari, 2008).

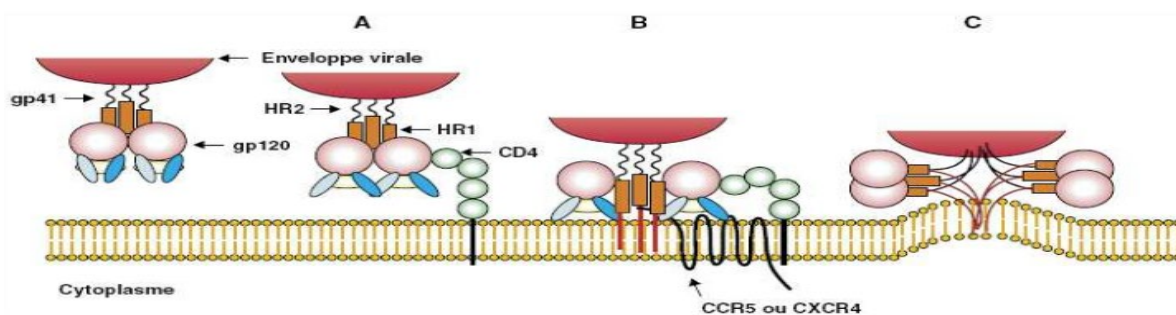


Figure5: Changements de conformation au cours de l'entrée du VIH dans la cellule cible(Leghmari, 2008).

Une fois entrée dans le cytoplasme, la capsid virale se désassemble. L'ARN simple brin et les protéines virales sont libérés et participent à la formation du complexe de réplication.

Celui-ci est composé de l'ARN viral, la protéine de matrice (MA), de nucléocapside (NC), la RT, l'intégrase, la protéase, VpreT l'ARN de transfert Lys3 (Sagna, 2012).

1.1.9.2 Transcription inverse

La transcription inverse de l'ARN viral en ADN double brin est la caractéristique principale des rétrovirus. C'est un processus complexe et ordonné, qui commence immédiatement après l'entrée du corps (capside) du virion dans le cytoplasme de la cellule infectée. La réaction a lieu au sein d'un grand complexe contenant les protéines MA, NC, RT, IN, Vpr, l'ARN viral et plusieurs protéines de la cellule hôte.

1.1.9.2.1 Formation du petit brin négatif d'ADN « strong stop DNA »

Cette étape est initiée grâce à l'ARN_t^{lysine} portant un groupement 3' utilisé comme amorce pour la synthèse de l'ADN. Cet ARN_t se fixe d'abord sur l'ARN viral au niveau du site pbs « primer binding site ». La RT reconnaît le complexe ARN_t/ARN et initie la transcription inverse en procédant à l'élongation de l'extrémité 3' de l'amorce, synthétisant ainsi le brin négatif d'ADN jusqu'à l'extrémité 5' de l'ARN viral. L'ADN formé à cette étape s'appelle brin négatif d'ADN (Leghmari, 2008).

1.1.9.2.2 Synthèse du long brin négatif d'ADN

L'hybridation du petit brin négatif d'ADN « strong stop » à la séquence R crée une amorce d'initiation d'ADN et la RT peut alors continuer l'élongation du brin négatif pour former un long brin négatif d'ADN. Pendant la synthèse du long brin négatif, la RNase H procède à la dégradation de l'ARN du complexe hybride ARN/ADN. Cependant, deux séquences d'ARN, résistantes à la RNase H, sont épargnées. Il s'agit des séquences ppt « polypurin tract ». L'une à côté du U3 du LTR 3' et l'autre au centre du génome nommée cppt. (Figure 6) (Leghmari, 2008).

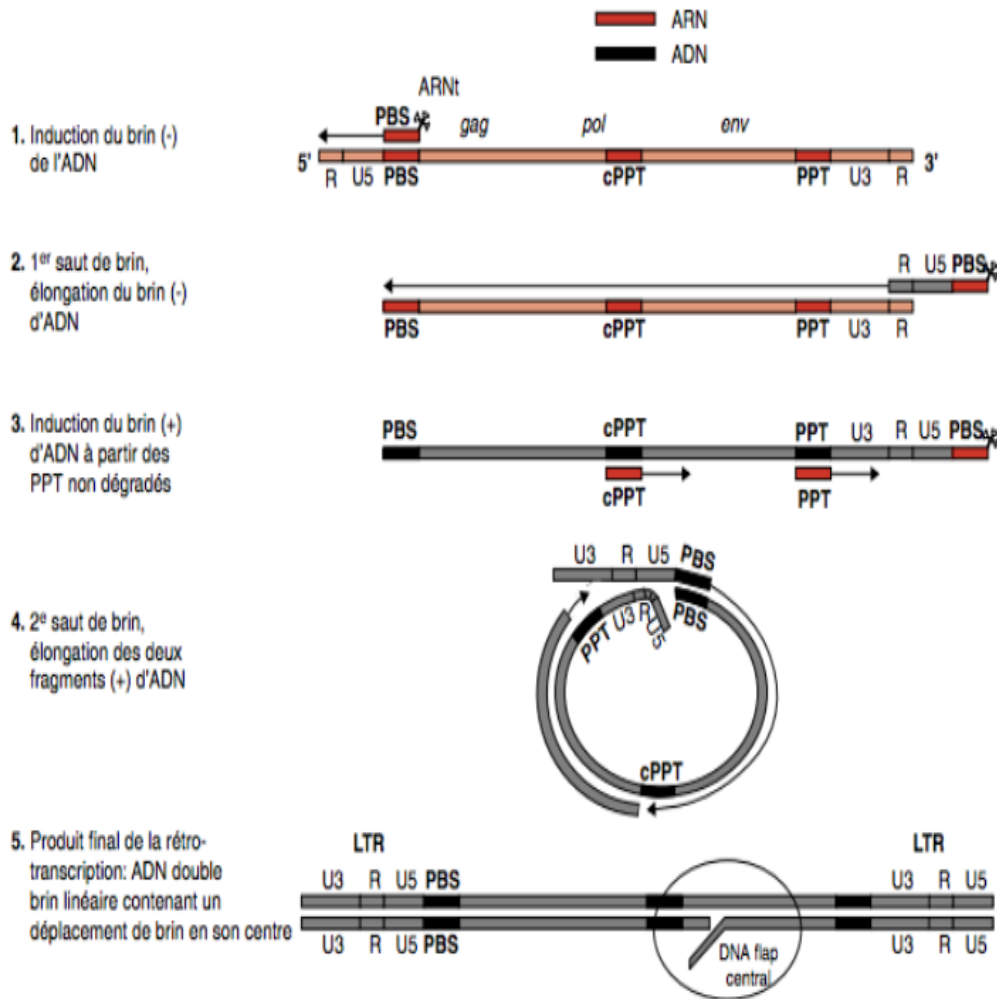


Figure 6: Transcription inversede l'ARN Viral(Leghmari, 2008).

1.1.9.2.3 Initiation de la synthèse du brin positif d'ADN

Ces séquences d'oligonucléotides (ppt et cppt) restent liées au brin négatif d'ADN et servent d'amorces pour la synthèse du brin positif d'ADN avant d'être éliminées. La synthèse progresse vers l'extrémité 5' du brin négatif, en commençant par copier les séquences U3, R et U5 et continue pour copier la portion d'ARNt encore présente en 5'. L'élongation s'arrête au niveau des bases modifiées qui se trouvent normalement en position 19 de l'ARNt. Le brin d'ADN naissant s'appelle brin positif (Leghmari, 2008).

1.1.9.3 Intégration de l'ADN proviral

Avant de pouvoir s'intégrer, le génome viral doit d'abord traverser la membrane nucléaire. Une fois la transcription inverse terminée et au moment de la maturation du PIC (ADN

proviral, IN, MA, Vpr, et RT) essentiel pour l'import nucléaire.

Le PIC utilise les microtubules pour pénétrer dans le noyau et accède ainsi au noyau et permet l'intégration de l'ADN viral dans le génome de l'hôte grâce à l'action de l'intégrase (Sontie, 2010).

L'IN est liée à une séquence d'attachement dite « att » située aux deux extrémités de l'ADN viral au sein des LTR. Dans un premier temps, l'IN catalyse une coupure au niveau des séquences consensus CAGT des deux extrémités 3'-OH de l'ADN viral après un dinucléotide CA. L'IN va, après translocation dans le noyau, rapprocher l'ADN viral et l'ADN cible, puis l'ADN sera réparé par la machinerie cellulaire (figure 7) (Carayon, 2008).

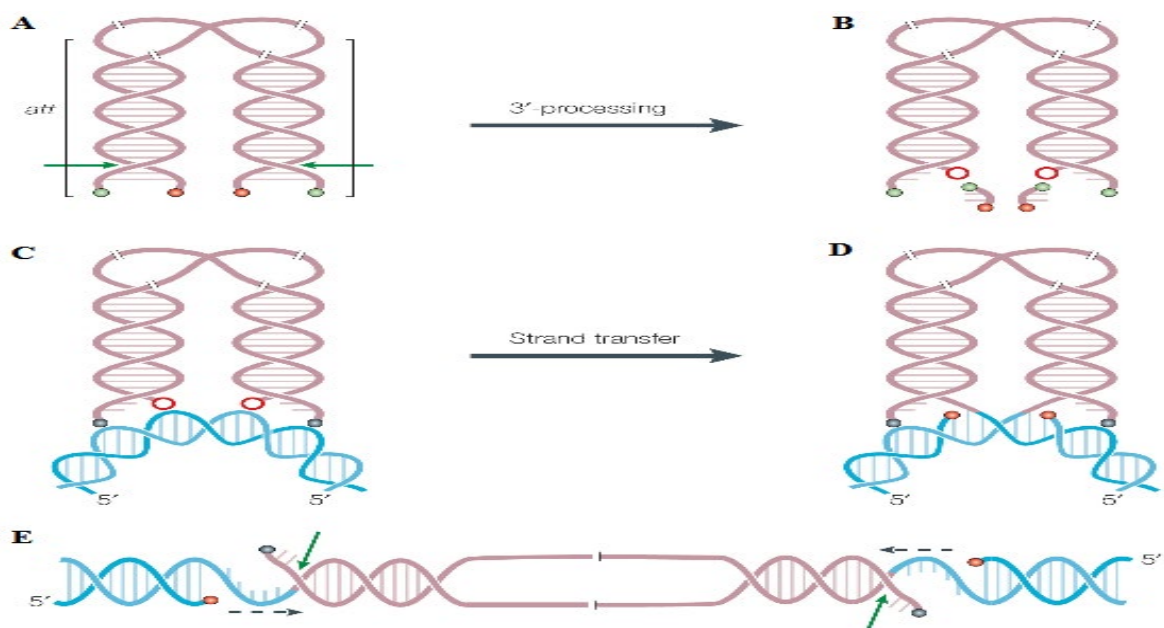


Figure 7: l'intégration de l'ADN proviral (Carayon, 2008).

Le virus est maintenant présent dans la cellule sous forme de provirus. Le provirus peut être présent sous deux états latent ou répliatif. Le virus peut être intégré dans bien des localisations sur les divers chromosomes, mais il aura tendance à choisir des régions transcriptionnellement actives et évitera les régions répétées des centromères afin d'assurer sa transcription (Carayon, 2008).

1.1.9.4 la transcription

La première étape de transcription permet la production de faibles quantités d'ARN messagers viraux appelés ARNs précoces de régulation qui vont être à l'origine de trois protéines de régulation : Tat, Nef et Rev, mais la polymérase seule ne permet pas l'élongation du transcrit

naissant, la transcription est rapidement bloquée par le facteur N-TEF « Negative Transcriptional Elongation Factor ». Ceci résulte en l'accumulation de transcrits courts. Afin de remédier à ce blocage, le virus met en jeu un activateur transcriptionnel (Leghmari; 2008).

La protéine Tat Cette protéine régulatrice est un trans -activateur puissant de la transcription qui intervient au niveau de la séquence LTR (Long Terminal Repeat) du génome viral, et se lie sur l'élément TAR, une séquence qui se forme spontanément à l'extrémité 5' de tous les ARNm du virus.

Par la liaison de Tat et la cycline T1, Tat recrute l'activité kinase de l'enzyme Cdk9 (Cyclin-dependent kinase 9), qui va induire la phosphorylation de l'ARN polymérase II (figure 8) (Vitte, 2006).

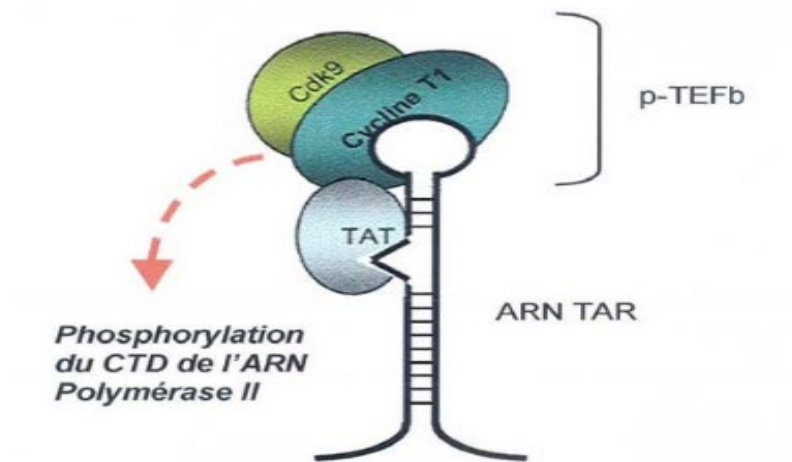


Figure 8: Rôle de la protéine TAT (Vitte, 2006).

1.1.9.5 l'Épissage des ARN pré-messagers

L'épissage des ARN pré-messagers est indispensable dans la production des protéines rétrovirales de VIH-1. Les transcrits primaires sont gardés dans une forme non épissée pour servir d'ARNm pour la production du précurseur Gag-Pol ou être transportés dans le cytoplasme pour servir de génome pour les nouveaux virions. Ils peuvent aussi subir le processus d'épissage alternatif pour obtenir les différentes espèces d'ARNm qui permettront l'expression des protéines virales.

Dans le virus VIH-1, l'épissage d'un transcrit primaire peut être divisé en 3 classes principales:

- La classe, des transcrits épissés de façon multiple de 2 kb

- La classe, des transcrits simplement épissés de 4 kb.
- La classe, des transcrits ayant subi, l'épissage alternatif(Santerre, 2010).

1.1.9.6 Transport des ARN messagers et de l'ARN génomique

L'ARNm multi-épissé des protéines (Tat, Rev et Nef) du VIH-1 utilise une voie indépendante de Rev pour sortir du noyau (Leghmari, 2008).

L'analyse des domaines structuraux de Rev a permis de comprendre comment cette protéine virale exerce sa fonction au sein de la cellule. Par ailleurs, plusieurs travaux ont permis de définir un élément présent sur les ARNm contenant un ou plusieurs introns et permettant leur reconnaissance par Rev, l'élément RRE (Rev-Responsive Element).

Cette séquence est présente sur tous les ARNm viraux non ou partiellement épissés. La synthèse des protéines tardives du virus nécessite donc la présence de protéines Rev en quantités suffisantes, qui seront recrutées sur le RRE des ARNm viraux nouvellement transcrits et sortir du noyau (figure9)(Vitte, 2006).

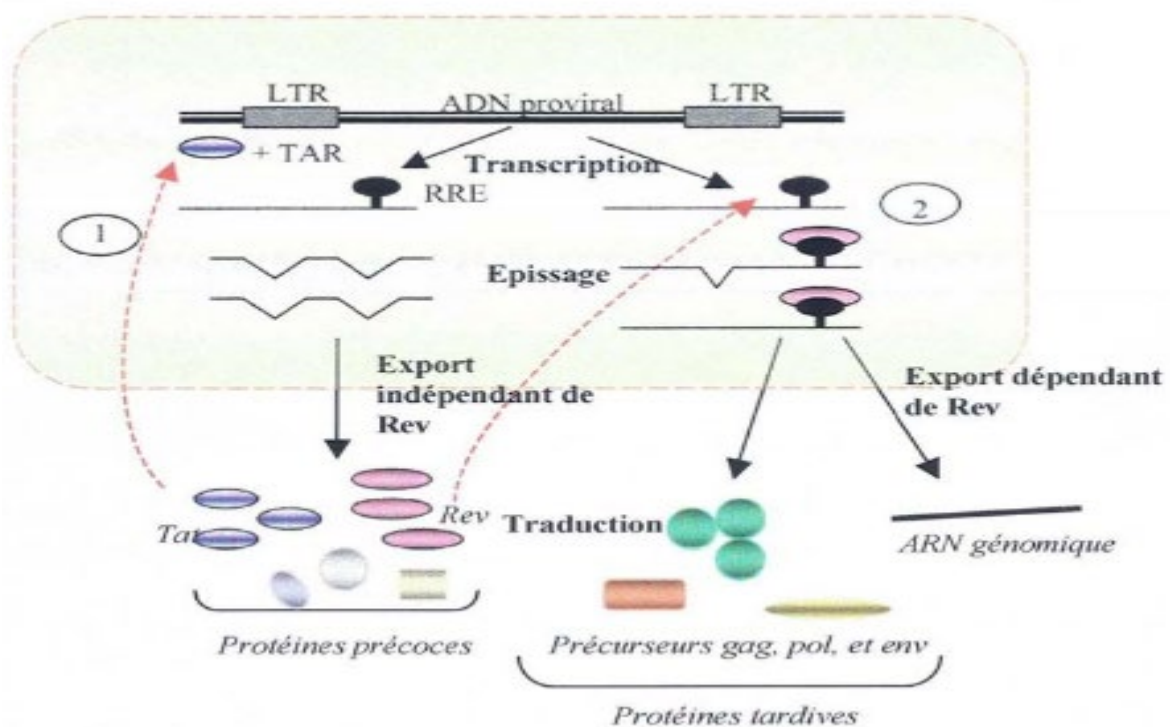


Figure 9: Transport des ARN messagers et de l'ARN génomique(Vitte, 2006).

1.1.9.7 La traduction

Les protéines synthétisées soit par l'entrée du ribosome à partir du cap 5', soit à partir d'IRES situés à la fois dans la région 5'UTR et dans la région codante. L'entrée ribosomale à

l'extrémité 5 'se produit par le recrutement d'un complexe trimérique composé de DDX3, PABP et eIF4G, tandis que l'entrée interne a lieu par liaison directe du complexe de pré initiation 43S aux éléments IRES (figure 10) (Ohlmann, 2014).

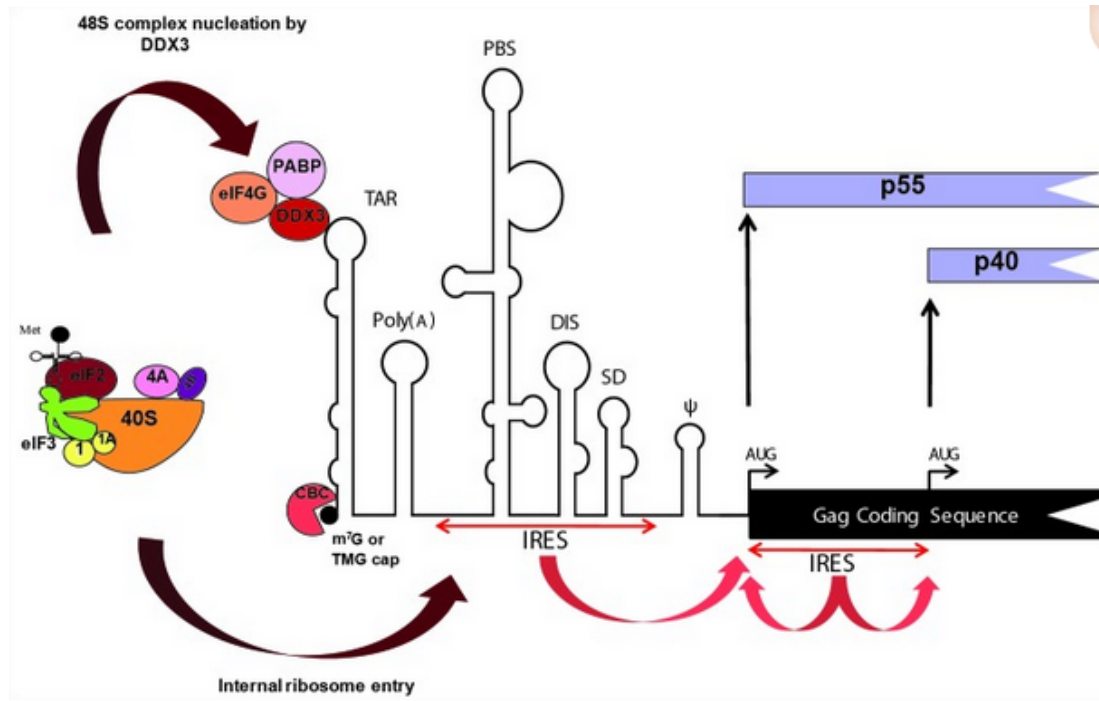


Figure 10: la structure des ARNm du VIH-1(Ohlmann, 2014).

Il existe deux types d'ARN pendant le cycle viral de VIH-1: des ARNm codant les protéines structurales et enzymatiques et des ARN génomiques (ARN-g).

Le début de la traduction de l'ARNm de longueur totale du virus de l'immunodéficience humaine peut se produire via plusieurs mécanismes différents pour maintenir la production de protéines structurales virales tout au long du cycle de réplication.

Les études d'ARNm cellulaires, hébergeant un mode de double initiation tel que celui présenté par l'ARNm du VIH-1, montrent, que dans des conditions physiologiques normales, la traduction dépendant du cap serait le mécanisme prédominant utilisé pour la traduction.

Par contre dans des conditions de stress, où le VIH-1 modifie l'homéostasie cellulaire en modifiant plusieurs composants de l'appareil de traduction de l'hôte, ce qui entraîne l'inhibition de la traduction dépendant du cap. Par exemple, VIH-1 induit une augmentation cellulaire endogène d'intermédiaires réactifs de l'oxygène conduisant à un stress oxydatif qui a été démontré qu'il facilitait l'activation de la transcription du VIH, et stimulait l'activité de VIH-1 5'UTR IRES. De plus, l'expression de la protéine virale R (Vpr), qui favorise l'arrêt du

cycle cellulaire en phase G2 / M, et la protéase virale VIH-1 nécessaire au traitement des protéines virales, peut cliver les facteurs d'initiation eIF4G, et PABP. La protéolyse de eIF4G entraîne une répression de la traduction dépendant de la coiffe, ce qui dans ces conditions empêche l'initiation de la traduction coiffe-dépendante. La synthèse des protéines est dans ces conditions assurée à partir des IRES (Ohlmann, 2014).

Le virus VIH utilise le recodage ou le changement du cadre de lecture en -1, ce décalage requis pour synthétiser Gag-Pol, le précurseur des enzymes du VIH-1, c'est-à-dire la protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase, lors de la traduction de l'un des ARN messagers du virus. La traduction du même ARN suivant les règles classiques conduit à la synthèse de Gag, le précurseur des protéines structurales du virus qui sont la matrice, la nucléocapside, la capsid et la protéine p6. Seul un petit nombre de ribosomes effectuent le décalage de phase, et l'utilisation de cette stratégie permet d'obtenir une quantité de Gag-Pol par rapport à Gag qui répond aux besoins du virus (figure 11) (Dulude, 2006).

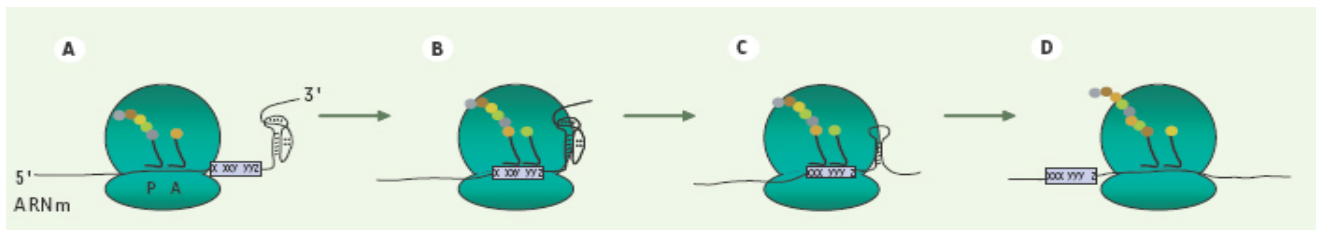


Figure 11: mécanisme de décalage de phase en -1 (Dulude, 2006).

1.1.9.8 Bourgeonnement et maturation du virion

L'assemblage des virions du VIH-1 se produit au niveau de la membrane plasmique. La poly protéine VIH-1 Gag (et Gag-Pol) est elle-même responsable de tous les événements essentiels de l'assemblage des virions (wesley, 2012).

La maturation du virion libéré se fait en plusieurs temps qui correspondent chacun à un type de clivage de PR. Les clivages de Gag vont aboutir aux protéines structurales MA, CA et NC, ceux de Gag-Pol, à MA, CA, NC (figure 12) (Santerre, 2010).

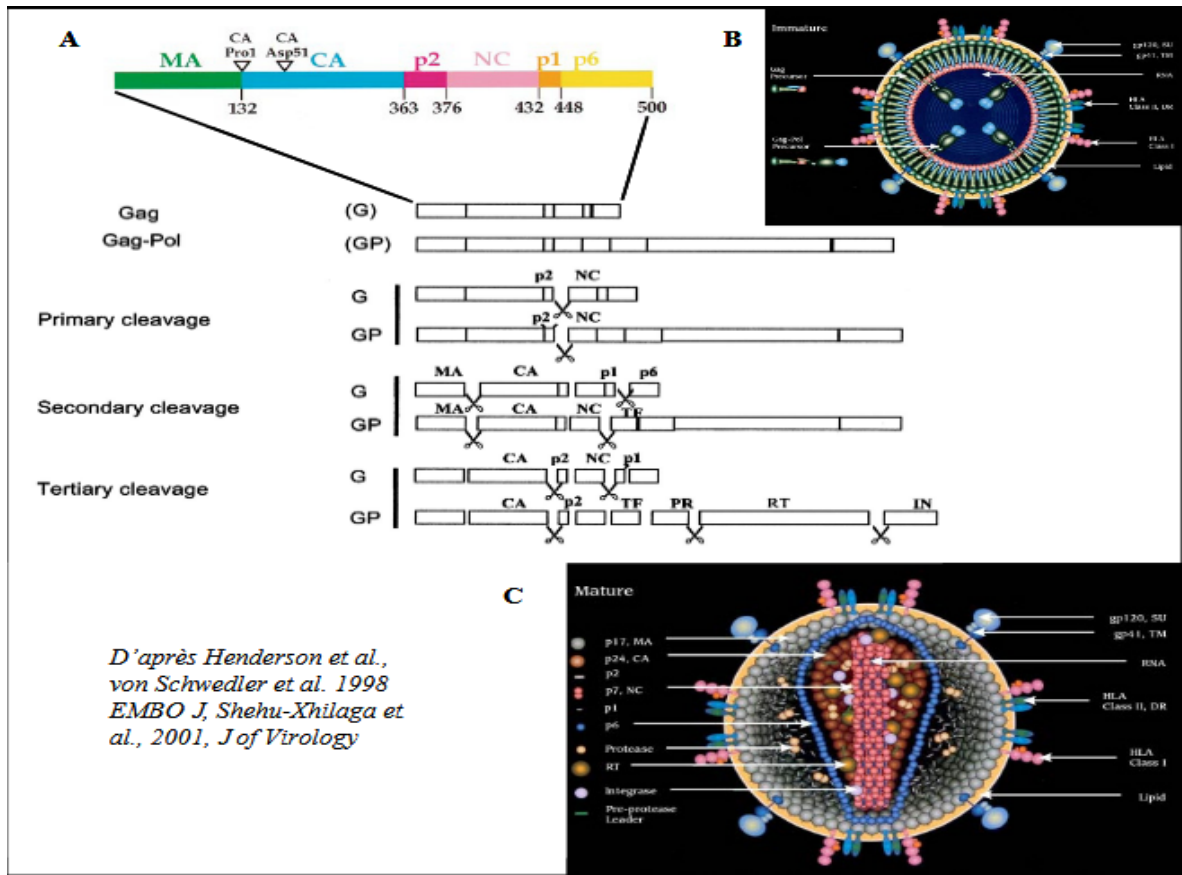


Figure 12: Maturation du virion du VIH par la protéase(Santerre, 2010)

Le domaine p6 de Gag contient des séquences qui interagissent directement avec des composants et peuvent fusionner avec la membrane par une exocytose. La protéine Vif est importante pour l'assemblage correct de la particule virale (Santerre, 2010).

Cet événement naissant qui libère le virion de la membrane plasmique est médié par la machinerie hôte ESCRT (complexes de tri endosomal requis pour le transport) (Figure 13) (wesley, 2012).

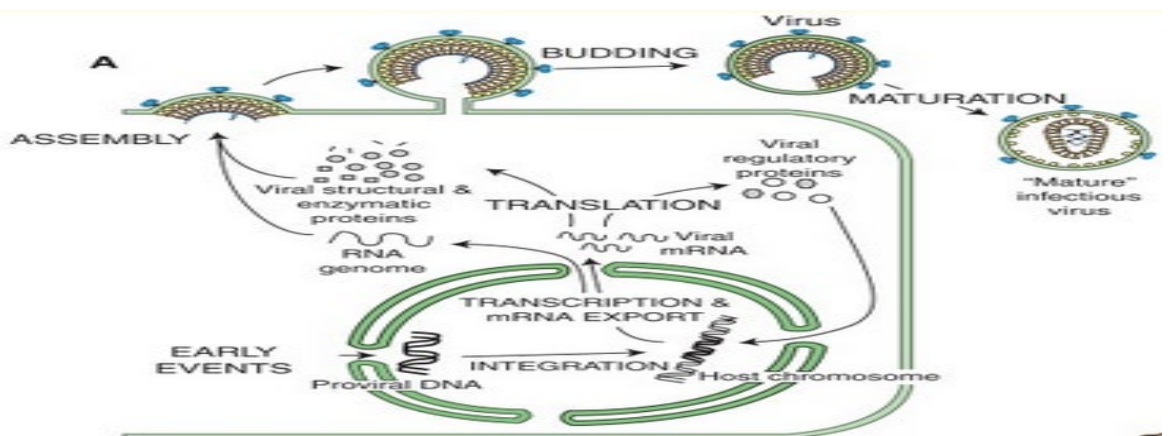


Figure 13: Bourgeonnement et maturation du virion

1.2 Épidémiologie

1.2.1 Situation épidémiologique du sida dans le monde et en Algérie

1.2.1.1 Dans le monde

Dans le monde, le rapport mondial de 2018, établi par ONUSIDA, sur la pandémie durant l'année 2017, indique que:

- Le nombre de personnes vivant avec le VIH est estimé à 36.9 millions.
- Depuis 2010, les nouvelles infections par le VIH chez les adultes ont diminué d'environ 16 %
- Passant de 1.9 millions à 1.6 millions en 2017.
- Les nouvelles infections par le VIH chez les enfants ont diminué de 35 % depuis 2010, de 270 000 en 2010 à 180 000 en 2017.
- Les décès liés au SIDA ont diminué de 51 % depuis 2004.
- En 2017, un total de 940 000 personnes sont mortes des suites des maladies liées au SIDA dans le monde, contre 1.4 millions en 2010.

En Algérie

En Algérie, le rapport du Laboratoire National de Référence du VIH/SIDA de l'Institut Pasteur Algérie fait état:

- d'un total cumulé de 1985 (1er cas diagnostiqué) au 30/09/2018, de 12 083 cas dont 1885 cas au stade de SIDA et 10 198 cas de séropositifs.
- d'un nombre de 700 à 900 nouveaux cas d'infections à VIH diagnostiqués par an, au cours de ces 5 dernières années.

Le sexe et l'âge les plus touchés

La répartition par sexe et par groupe d'âge pour les personnes diagnostiquées positives pour le VIH entre 1985 et 2014, montre que les groupes d'âge les plus représentés sont ceux des 25 à 39 ans avec un sexe ratio homme/femme de 1.36 et le groupe des 20-24 ans où le nombre de femmes diagnostiquées est plus important avec un sex-ratio de 0,77. Aucune région du territoire national n'est épargnée.

en 2014, un nombre total de 657 699 tests VIH ont été réalisés. Parmi les personnes qui se sont fait dépistées, 85% ont retiré leurs résultats. Le taux de dépistage global des femmes testées est deux fois plus élevé (452 475 tests) que celui des hommes (205 224 tests).

1.2.2 Mode de transmission du VIH

Le VIH est retrouvé dans les liquides biologiques tels que le sang, le liquide céphalo-rachidien (LCR), le sperme, la salive, les sécrétions vaginales, le lait, les larmes, et les urines. Sa transmissibilité, comme celle de tout autre virus, dépend de la charge virale, de la résistance physique du virus, du degré d'immunité du sujet infecté et de la réceptivité de la personne exposée. Il existe trois principaux modes de transmission (Leghmari, 2008).

1.2.2.1 la transmission par voie sexuelle

A l'échelon mondial, la grande majorité des infections par le VIH ont été acquises à l'occasion de rapports sexuels non protégés. La transmission sexuelle de l'infection à VIH se fait:

- Avec pénétration anale ou vaginale, qu'elles soient hétérosexuelles ou homosexuelles.
- La contamination se ferait plus facilement par les lésions microscopiques qui ont lieu au cours de la pénétration. Ceci permet le contact du virus présent dans le sperme ou dans les sécrétions vaginales avec le courant sanguin ou lymphocytaire du receveur.
- Chez la femme, la période des règles est la plus infectante du fait du saignement.
- Les contacts oro-génitaux peuvent transmettre le VIH s'il existe des lésions dans la bouche ou sur le sexe.

Il n'y a pas de transmission par les baisers même profonds. Toutefois la transmission par cette voie est possible si du sang contaminé entre en contact avec une lésion dans la bouche du receveur.

1.2.2.2 La transmission par voie sanguine

Elle concerne principalement trois groupes de populations : les UDI, les hémophiles et les transfusés et plus rarement les professionnels de santé en un lieu de soins et laboratoires victimes d'accidents exposant au sang.

Chez les usagers de drogues par voie injectable les pratiques de partage de seringues ou de produits entre les usagers de drogues par voie injectable en permettant l'inoculation d'une

petite quantité de sang par voie veineuse d'une personne infectée à une autre, peuvent conduire à la transmission du VIH (Sontie, 2010).

1.2.2.3 La transmission mère-enfant

Ce mode de transmission peut survenir à différentes étapes de la grossesse. In utero, dans les semaines précédant l'accouchement dans un tiers des cas, au moment de l'accouchement dans deux tiers des cas, la période de l'allaitement présente également un risque d'infection pour l'enfant, estimé entre 5 à 7% cette transmission mère-enfant est fortement contrôlée grâce aux traitements antirétroviraux administrés aux femmes enceintes soit au début ou au dernier trimestre de la grossesse(Sontie, 2010).

1.3 Diagnostic virologique

1.3.1 Marqueurs biologiques et leur évolution

Les marqueurs biologiques recherchés en pratique courante à partir d'un prélèvement sanguin sont:

- Les anticorps anti-VIH (AC anti-VIH), recherchés par des techniques sérologiques de dépistage et de confirmation.
- L'antigène p24 (Ag p24), recherché par des techniques immuno-enzymatiques (ELISA).
- L'ARN du VIH-1(ARN-VIH), recherché par des techniques de biologie moléculaire. La recherche de l'ADN proviral et l'isolement du virus par culture ne sont pas des examens courants. Ils ne sont réalisés que dans les laboratoires spécialisés équipés pour de telles analyses.

L'évolution naturelle des marqueurs sérologiques au cours de l'infection VIH est triphasique: la primo-infection, la phase de latente et le stade sida (figure 14) (**Guide, 2015**).

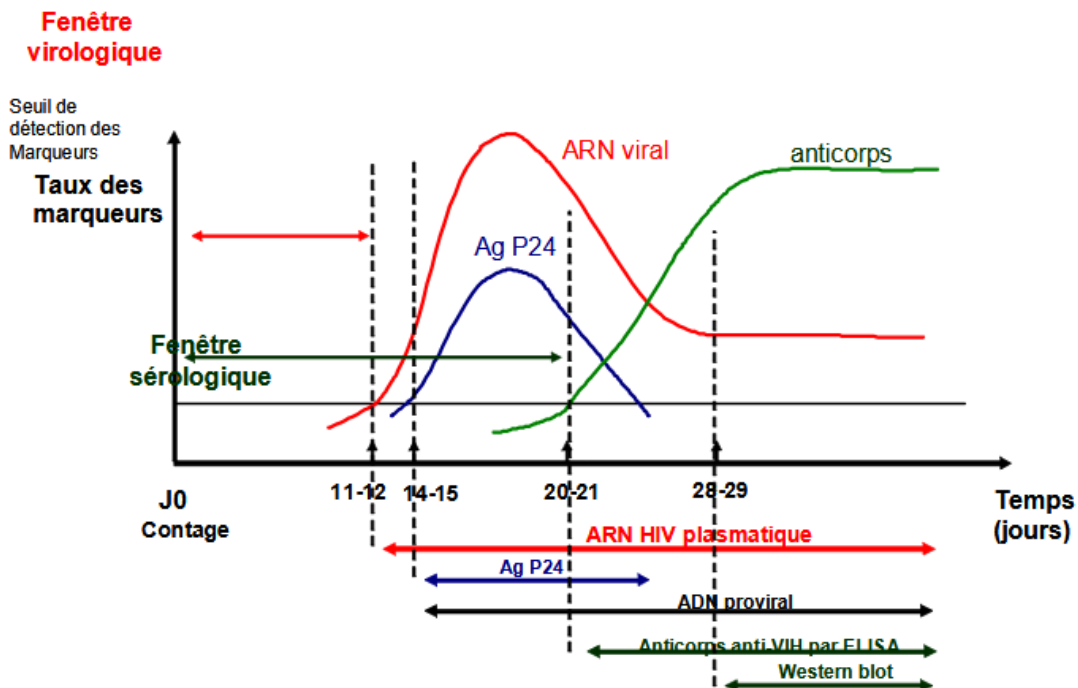


Figure 14: Evolution des marqueurs biologiques (**Guide,2015**)

1.3.1.1 La primo-infection

La primo-infection commence après la transmission du virus, elle est caractérisée par une réplication importante du virus entraînant la destruction des lymphocytes CD4+. Cette étape est suivie par une réponse inflammatoire importante caractérisée par l'apparition d'anticorps anti-VIH par stimulation des lymphocytes B et une réponse cytotoxique des lymphocytes CD8+ permettant de contenir l'infection. C'est cette production d'anticorps anti-VIH qui rend le patient séropositif.

1.3.1.2 La phase asymptomatique: phase de latence

Durant la phase asymptomatique qui est de durée variable (quelques mois à plusieurs années), le virus se multiplie activement diminuant progressivement le taux de lymphocytes CD4+. Le système immunitaire contrôle l'infection jusqu'à l'épuisement des CD4+.

1.3.1.3 La phase symptomatique ou phase SIDA

Cette phase est caractérisée par l'apparition des premiers signes cliniques de l'infection. Le sujet sans traitement est immuno-déprimé et des pathologies infectieuses ne peuvent plus être contrôlées par le système immunitaire préalablement détruit qui conduit alors au décès du patient(Matysiak, 2016).

1.3.2 Diagnostic sérologique: Diagnostic indirect

Le diagnostic indirect ou Sérologique de l'infection à VIH repose sur l'utilisation de deux types de tests: les tests de dépistage qui ont l'avantage d'être extrêmement sensibles et des tests de confirmation beaucoup plus spécifiques(Sontie, 2010).

1.3.2.1 Tests de dépistage

Le dépistage des anticorps anti-VIH s'effectue le plus souvent par des tests immuno-enzymatiques utilisant une phase solide fixant les antigènes VIH ou par des tests simples / rapides utilisant comme antigènes des lysats viraux ou des protéines recombinantes ou synthétiques(Guide, 2013).

1.3.2.1.1 Tests simples/rapides:

Il existe plusieurs tests de mise en évidence des anticorps anti-VIH aussi sensibles que les tests ELISA sans pour autant nécessiter un matériel spécial ou des compétences particulières. Tests rapides Ce sont, le plus souvent des tests dits immuno-chromatographiques, avec une filtration ou une migration du sérum sur une membrane ou un support recouverts d'antigènes recombinants VIH-1 et VIH-2. Leur simplicité d'emploi leur assure une large diffusion. Ils ne nécessitent aucun équipement, ni reconstitution de réactifs et ni réfrigération. Ils sont rapides car le résultat est donné en moins de 30 minutes. Par contre ils ne sont pas adaptés aux grandes séries, et doivent également être confirmés par une deuxième technique de principe différent (**Guide, 2015**).

1.3.2.1.2 Tests immuno-enzymatiques (EIA)

Tests ELISA de détection des anticorps

L'ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) reste la méthode de référence pour la détection des anticorps sériques du sujet infecté, mais nécessite un appareillage spécifique. Les tests ELISA sont nombreux et se basent sur l'utilisation d'une phase solide (billes ou puits de microplaques) sur laquelle sont fixés des antigènes VIH. La majorité des tests utilisent des protéines recombinantes produites par génie-génétique ou des peptides synthétiques. Ces tests ELISA possèdent une excellente sensibilité (réduisant la fenêtre pré-sérologique) et une bonne spécificité (**Guide, 2013**).

Tests combinés antigène-anticorps

Un seul test ELISA mixte, combiné, à lecture objective permettant la détection des anticorps anti-VIH-1 et anti-VIH-2 et de l'antigène p24 du VIH-1 avec un seuil minimal de détection de l'antigène p24 du HIV-1 de deux unités internationales par millilitre (tests combinés de 4^{ème} génération)

Les méthodes immuno-enzymatiques de type ELISA sont actuellement les méthodes de référence pour mettre en évidence les anticorps sériques du sujet infecté. Les antigènes utilisés pour ces tests étaient initialement des lysats de cellules infectées par le VIH. Actuellement, la majorité des tests utilisent des protéines recombinantes produites par génie génétique ou des peptides synthétiques. Les antigènes doivent être les plus représentatifs possibles de l'ensemble des virus en circulation. Les tests actuels sont sensibles et spécifiques, ils permettent la détection des primo-infections, révélant la présence d'anticorps en moyenne 22 jours après la date présumée de la contagion (figure 15) (**Sontie, 2010**).

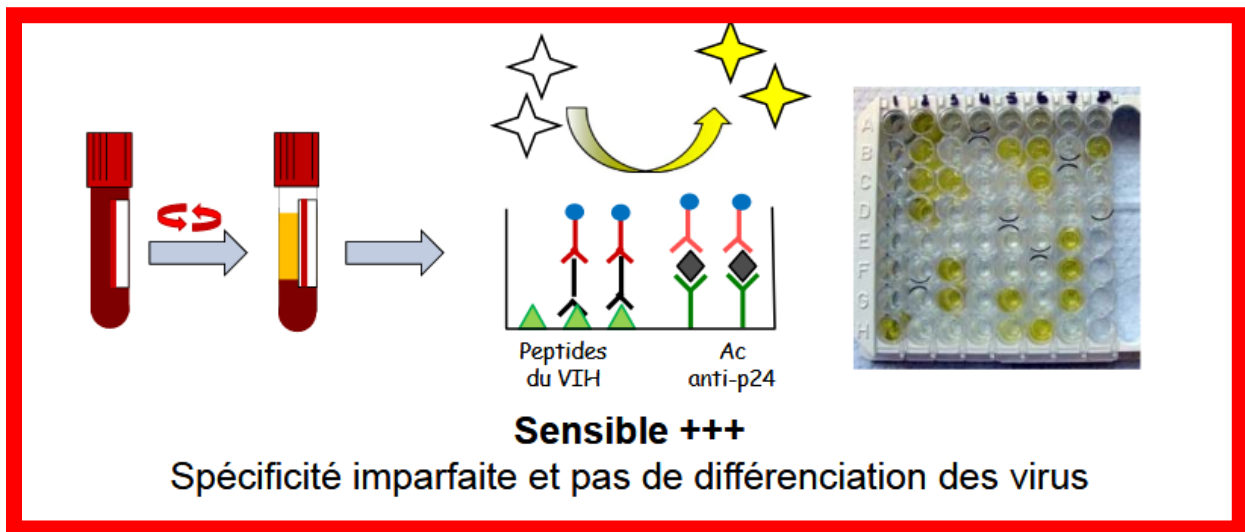


Figure 15: Tests combinés antigène-anticorps(Sontie, 2010).

1.3.2.2 Tests de confirmation

Le Western blot est actuellement la méthode de référence, il met en évidence et distingue les anticorps dirigés contre les différentes protéines constitutives du VIH-1 ou du VIH-2. Les critères d'interprétation sont proposés par divers organismes internationaux.

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), un résultat positif ne peut être confirmé que si deux bandes au moins sont objectivées parmi les glycoprotéines d'enveloppe. La présence des anticorps anti protéines de l'enveloppe peut être associée ou pas à des anticorps dirigés contre les protéines du gène gaget/ou Pol (Tableau2)(Guide,2015).

La technique de référence est le Western Blot. Dans un premier temps, les protéines virales sont séparées selon leur masse moléculaire par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu dissociant, puis transférées sur membranes de nitrocellulose, cette dernière est ensuite découpée en bandes longues et étroites. Dans un second temps, les sérums à tester sont mis à incuber en présence des bandelettes de nitrocellulose; les anticorps présents se fixent en fonction de leur spécificité sur les protéines virales préalablement séparées; on révèle leur présence par addition d'une anti-globuline humaine marquée par une enzyme, puis d'un substrat chromogène.

Cette méthode longue et coûteuse est aujourd'hui d'utilisation aisée dans les laboratoires grâce à la commercialisation de bandelettes prêtes à l'emploi, qui épargnent à l'utilisateur les étapes délicates de la préparation de l'antigène de l'électrophorèse et du transfert. La présence d'anticorps anti-protéines constitutives du virus dans les échantillons étudiés se traduit par

l'apparition de bandes spécifiques colorées dont la position correspond aux masses moléculaires des protéines majeures du virus. Les bandes doivent être retrouvées dans des positions identiques à celle observées sur les indispensables bandelettes témoins et doivent être interprétées avec précaution et selon certains critères bien établis (figure 16) (Sontie,2010).

Tableau02: critères d'interprétation du western blot selon l'OMS

Interprétation	Profil
Négatif	Absence de bandes
Positif	2 ENV +/- GAG +/- POL
Indéterminé	1 ENV +/- GAG +/- POL
	GAG + POL
	POL
	GAG

Env: enveloppe, GAG: groupe d'antigènes, POL: polymérase

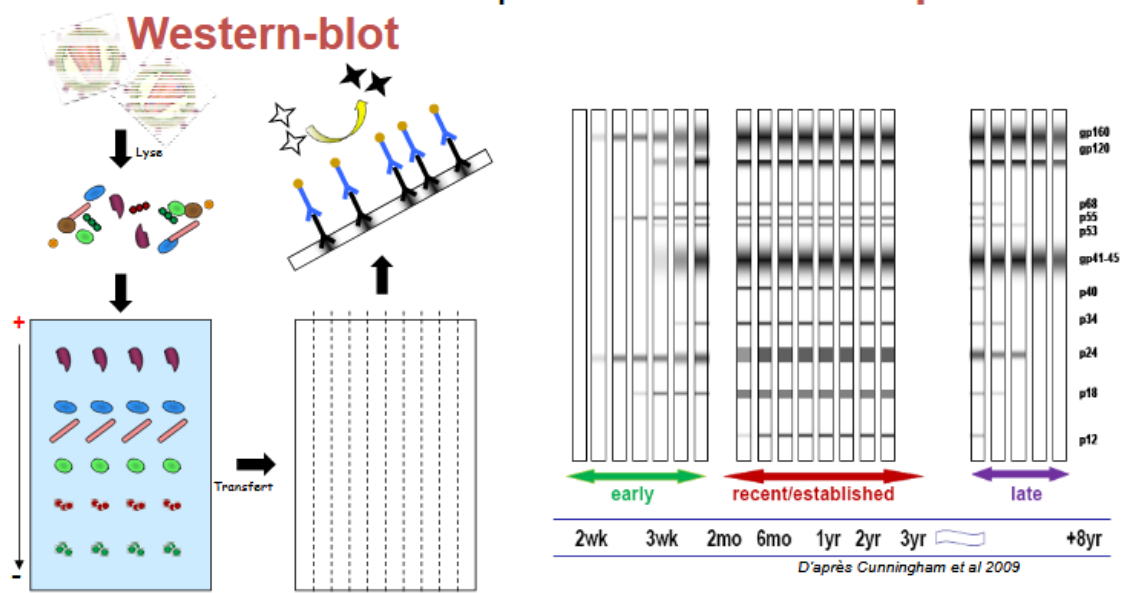


Figure 16: tests de confirmation(Sontie,2010).

1.3.3 Diagnostic direct: Mise en évidence du virus ou de ses constituants

1.3.3.1 Test de détection de l'antigène p24

Les antigènes viraux circulants correspondent aux particules virales et aux protéines virales libres.

Les méthodes ELISA commercialisées détectent essentiellement la protéine p24 du VIH-1. La positivité de la réaction doit être confirmée par un test de neutralisation qui inhibe spécifiquement la détection de l'antigène et permet d'exclure ainsi un éventuel faux positif. La recherche de l'antigène p24 dans le sérum est aujourd'hui pratiquée en cas de suspicion de primo-infection lorsque les anticorps ne sont pas encore apparus (Sontie, 2010).

1.3.3.2 Isolement du virus en culture cellulaire

C'est une méthode longue, coûteuse, nécessitant un laboratoire de haute sécurité. Son indication est limitée et réservée à la préparation des stocks viraux pour la caractérisation de virus atypiques ou résistants aux antirétroviraux. (Guide, 2015).

1.3.3.3 Technique de biologie moléculaire

Il s'agit de la technique de RT/PCR quantitative qui permet d'évaluer la charge virale plasmatique. La charge virale désigne la quantification de l'ARN plasmatique du VIH, réalisée par PCR en temps réel. Celle-ci est exprimée en nombre de copies/ml et en log (base 10). C'est le log 10 du nombre de copies/ml qui est utilisé pour évaluer la variation dans le temps de la charge virale.

La charge virale est définie en mesurant la concentration de l'ARN viral dans le sang; elle indique le nombre de virions dans l'organisme et par voie de conséquence la vitesse de réplication du VIH dans l'organisme. Par ailleurs, dans la progression normale de l'infection à VIH constatée chez la plupart des patients, la charge virale augmente dès la contamination avant de régresser. Une charge virale est généralement détectable au bout des 15 premiers jours, suivant la contamination. Ce test peut rentrer dans le cadre du diagnostic mais si une valeur positive est significative, une charge virale indétectable n'est absolument pas significative (Razina, 2008).

1.3.3. Dépistage de l'infection à VIH

Le dépistage de l'infection par le VIH, en Algérie repose sur deux algorithmes c'est à dire deux protocoles faisant appel à différentes étapes reposant sur des techniques de principes différentes.

1.3.3.1 Algorithme 1: Dépistage de l'infection à VIH dans un Centre de dépistage (CD)

Cet algorithme est à appliquer dans le dépistage de l'infection à VIH/SIDA dans une structure chargée du dépistage

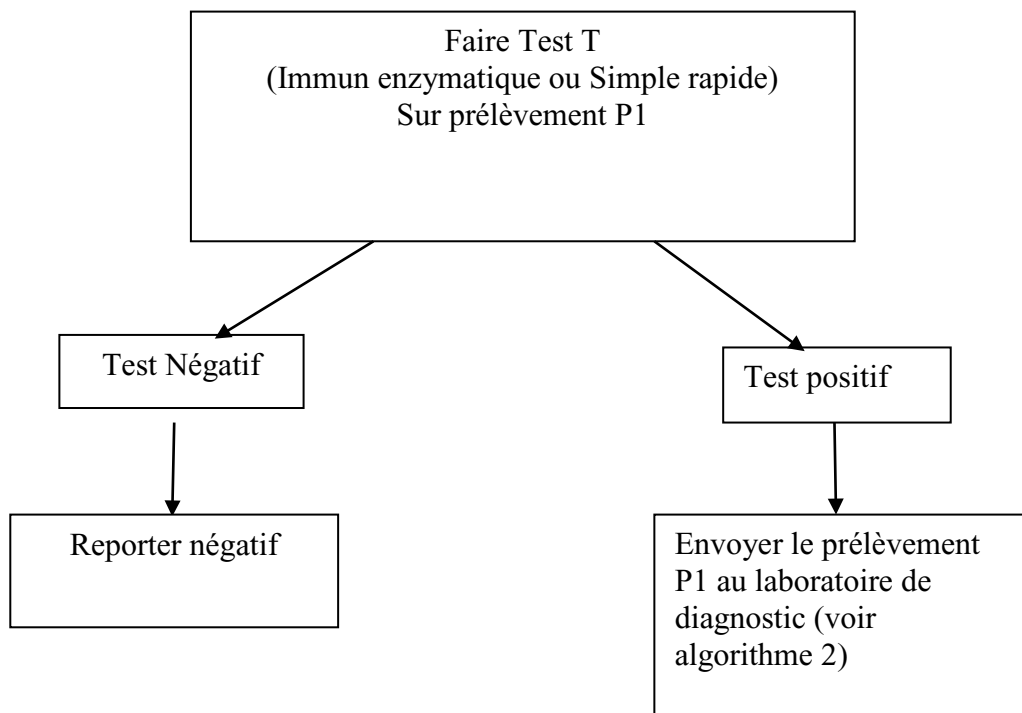
Il faut faire appel à un seul prélèvement de sang P, qui est analysé par un test T de type immuno-enzymatique ou simple/rapide.

Deux situations sont possibles:

1^{ère} situation: le test T est négatif, il y a lieu de considérer le résultat « négatif »

2^{ème} situation: le test T est positif, il y a lieu d'envoyer le prélèvement au laboratoire de diagnostic pour la confirmation (conformément à l'algorithme 2) (**Guide, 2015**)

Dépistage de l'infection à VIH dans un Centre de dépistage (CD)



1.3.3.2 Algorithme 2: Diagnostic sérologique de l'infection due au VIH chez l'adulte et l'enfant âgé de plus de 18 mois

L'analyse du prélèvement de sang P1 est effectuée par un premier test T1 de type immuno-enzymatique; deux situations sont possibles :

1^{ère} situation : le test T1 est négatif, il y a lieu de considérer le résultat « négatif ».

2^{ème} situation : le test T1 est positif, il y a lieu d'effectuer un deuxième test T2 de type immuno-enzymatique ou simple/rapide sur le même prélèvement de sang P1.

Dans cette situation, deux cas de figure sont possibles :

Les tests sont concordants : il y a lieu d'effectuer un troisième test **T3** de type Western blot, immuno-enzymatique ou simple/rapide sur un deuxième prélèvement de sang **P2**.

Les tests sont discordants : il y a lieu de refaire les tests **T1** et **T2** sur le même prélèvement de sang **P1**.

Dans ce deuxième cas de figure, deux situations sont possibles :

1^{ère}situation: les tests **T1** et **T2** sont tous deux négatifs, il y a lieu de considérer le résultat «négatif».

2^{ème}situation: les tests **T1** et **T2** sont tous deux positifs ou discordants, il y a lieu de faire un test de confirmation **T3**de type Western blot ou immuno-enzymatique ou test simple/rapide) sur le deuxième prélèvement de sang **P2**.

- Si **T1** positif, **T2** positif et **T3** positif : il y a lieu de considérer le résultat « positif »

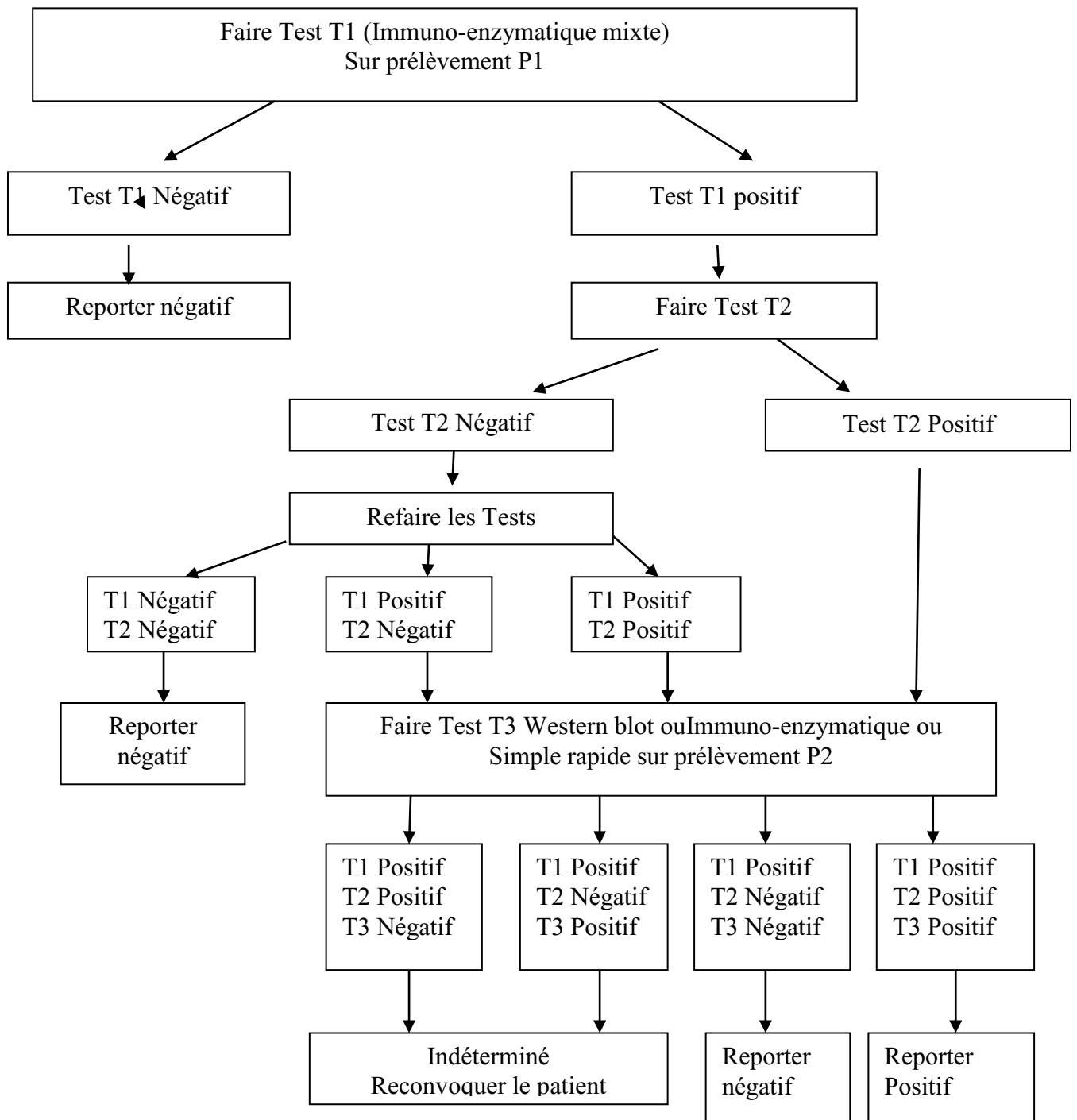
- Si **T1** positif, **T2** positif, **T3** négatif : il y a lieu de considérer le résultat « indéterminé » et de reconvoquer le patient dans un délai de 15 à 30 jours pour suivi.

- Si **T1** positif, **T2** négatif, **T3** positif : il y a lieu de considérer le résultat « indéterminé » et de reconvoquer le patient dans un délai de 15 à 30 jours pour suivi.

- Si **T1** positif, **T2** négatif, **T3** négatif : il y a lieu de considérer le résultat « négatif »

Les tests **T1**, **T2** et **T3** doivent être soit de principe différent soit de composition antigéniquedifférente (**Guide, 2013**).

Diagnostic sérologique de l'infection due au VIH chez l'adulte et l'enfant âgé de plus de 18 mois



1.4 Traitement

1.4.1 Traitement anti-VIH: trithérapie

Depuis 2013, conformément aux recommandations du groupe d'experts sous la direction du professeur Morlat dans leur rapport (Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH), il est préconisé d'instaurer une trithérapie antirétrovirale chez toute personne vivant avec le VIH, indifféremment du nombre de lymphocytes T CD4+ (**Albrecht, 2016**).

La thérapie antirétrovirale (TAR) est extrêmement bénéfique pour les personnes vivant avec le VIH, ce qui conduit à une durée de vie presque normale. Commencer le TAR aussitôt que possible après l'infection est associé à une meilleure récupération du système immunitaire et à une réduction du fardeau du VIH et la suppression virale est associée à un faible risque de transmission du VIH à d'autres. Ainsi, le traitement antirétroviral est la norme de soins pour les personnes vivant avec le VIH. Cependant, ce traitement a également des limites. Il neutralise mais n'élimine pas le VIH du corps. Le virus reste à l'état latent et si le traitement antirétroviral est interrompu, la charge virale augmente (**Henderson, 2018**).

Le traitement antiviral de l'infection par le VIH utilise trois ou quatre antiviraux prescrits simultanément pour éviter que le virus devienne résistant à ces substances. En effet, de nombreuses études cliniques ont montré que, si le VIH parvient assez facilement à résister à un ou deux antiviraux, il lui est beaucoup plus difficile de devenir résistant à trois médicaments pris ensemble (une trithérapie), à condition que le patient prenne son traitement très régulièrement, sans sauter de prise (**Albrecht, 2016**).

Tout patient symptomatique doit être traité, ainsi que tout patient ayant des TCD4 inférieurs à 200/mm³ (la normale est supérieure à 500/mm³).

Pour les patients asymptomatiques avec des TCD4 entre 200 et 500/mm³, l'indication repose sur l'évolution des TCD4 et la charge virale VIH : si elle est supérieure à 50 000 copies/ml, le traitement est fortement recommandé du fait de la corrélation entre la charge virale et l'évolution vers le Sida (**Razina, 2008**).

La trithérapie est composée de deux inhibiteurs nucléosidiques/nucléotidiques de la transcriptase inverse et d'une troisième molécule appartenant à l'une des trois classes suivantes:

Inhibiteurs de la protéase, boostés par le ritonavir sont des molécules de nature encore différente qui ciblent une autre étape du cycle viral. En présence d'antiprotéase, la maturation des précurseurs des protéines constitutives de la particule virale est donc impossible ce qui bloque la formation des particules virales ou engendre des particules incomplètes et non infectieuses.

Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse: ils ne rentrent pas non plus en compétition avec l'ARN génomique viral au site actif de l'enzyme.

Ces médicaments agissent sans interférer directement avec les substrats de l'enzyme, ce sont donc des inhibiteurs non compétitifs. Ils sont spécifiques de la transcriptase inverse du VIH-1.

Inhibiteurs de l'intégrase: Ces molécules bloquent l'intégration de l'ADN provirale au génome de la cellule infectée. (Albrecht, 2016).

1.4.2 Traitement Post Exposition (TPE)

Un traitement d'urgence peut être recommandé lors de la survenue d'un AES Désignant indifféremment les accidents d'exposition au sang ou à un liquide biologique contaminé ou non par du sang, les accidents d'exposition au sexe et les accidents d'exposition chez les usagers de drogues par partage de matériel d'injection. Leur survenue induit nécessairement une prise en charge médicale, en service d'accueil des urgences puis une orientation vers des services de spécialité proposant éventuellement, l'instauration d'un traitement dit traitement post exposition.

Si le traitement post exposition est recommandé, il doit être instauré le plus rapidement possible, idéalement dans les 4 heures suivant l'accident, et au plus tard, dans les 48 heures. Ce traitement est sous la forme de médicaments qui vont par exemple empêcher le virus de se répliquer à l'intérieur des cellules immunitaires et prévenir ainsi l'infection permanente (Albrecht, 2016).

1.4.3 La résistance aux médicaments

Lorsque le VIH se multiplie dans le corps, il se transforme parfois et se modifie. Les variations du VIH qui se développent alors qu'une personne prend des médicaments anti-VIH peuvent conduire à des souches de VIH résistantes aux médicaments. Les médicaments anti-VIH qui contrôlaient auparavant le VIH d'une personne ne sont pas efficaces contre le nouveau VIH résistant aux médicaments. En d'autres termes, le VIH de la personne continue à se multiplier (Albrecht, 2016).

Revue Bibliographique

La résistance du VIH aux médicaments se développe lorsque les patients ne suivent pas le plan de traitement qui leur est prescrit, souvent parce qu'ils n'ont pas un accès régulier à un traitement et à des soins de qualité. Les sujets porteurs d'un virus résistant seront progressivement en échec thérapeutique et pourront le transmettre à autrui (**Albrecht, 2016**).

Enfin, le VIH reste une maladie hautement stigmatisée qui affecte les droits de l'homme, et la stigmatisation constitue un obstacle majeur à la participation à la prévention et au traitement du VIH. En bref, guérir plutôt que traiter le VIH reste un objectif scientifique et clinique important (**Henderson, 2018**).

2. Matériel et méthode

2.1 Présentation des structures de stage

L'étude a été réalisée en deux temps et dans deux lieux différents:

- ☞ L'EPH de Sidi Ali: dans cette structure, la détection de l'infection par le VIH est réalisée par le test rapide et le test immunologique.
- ☞ Le laboratoire national du diagnostic biologique de l'infection par le VIH, de l'institut Pasteur d'Algérie (IPA). Cette structure détecte le VIH par :
 - Des tests rapides grâce à des bandelettes.
 - Des tests immuno-enzymatiques combinés.
 - Le WESTERN BLOT.
 - La PCR en temps réel.

Au niveau du laboratoire de l'EPH le travail a été fait sur 33 échantillons pour le diagnostic sérologique par les tests rapides et le test immuno-enzymatique combiné (ADALTIS).

- Les 32 personnes (P1-P32) sont des donneurs de sang, et le 33ème patient est hospitalisé (P33).

Au niveau du laboratoire l'IPA le travail a été fait sur 5 échantillons appartenant à 5 patients différents:

- Deux échantillons (P'1, P'2) pour le diagnostic sérologique par le test rapide, le test immuno-enzymatique combiné (WANTAI VIH 1+2 Ag/Ab ELISA) et ARCHITECT CMIA
- Deux échantillons (P'3, P'4) par WESTERN BLOT test immuno-enzymatique de confirmation.
- Un échantillon (P'5) pour évaluer la charge virale après le traitement préconisé par le médecin traitant.

2.2 Test rapide

Le test a été fait sur deux échantillons au niveau de l'IPA et un échantillon au niveau de l'EPH.

Matériel et Méthode

Le test rapide VIH-1 et VIH-2 est un test immun-chromatographique qualitatif qui permet la détection des anticorps dirigés contre le VIH-1 et VIH-2 dans le sang, le sérum ou le plasma.

2.2.1 Matériels utilisés

Le matériel utilisé dans le test rapide est présenté en figures 17 et 18.

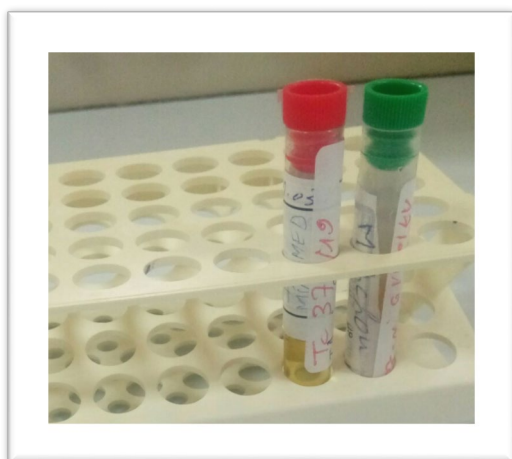


Figure 17: les échantillons

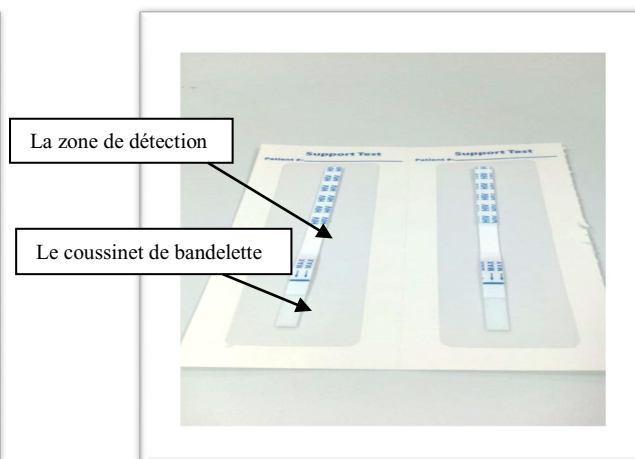


Figure 18: les bandelettes

2.2.2 Méthode

Le protocole utilisé dans le test rapide peut être décrit par les étapes suivantes:

- Mettre à température ambiante la bandelette, l'échantillon et la solution tampon avant le test.
- Retirer la bandelette de la pochette scellée et l'utiliser tout de suite.
- La bande adhésive doit être détachée de la carte test et collée à la bandelette test au milieu de la carte avec les flèches pointant vers le bas.
- Avec une pipette maintenue à la verticale, on dépose 2 gouttes de sérum /plasma /sang sur le coussinet de la bandelette puis 2 gouttes de solution tampon sont ajoutées.
- Attendre que la ligne rouge apparaisse au bout de 10 min.
- Lire le résultat qui se présente sous forme de bandes roses, après 20 min.

2.3 ELISA combiné Ag/AC (4^{ème} génération)

Les tests utilisés au niveau de l'EPH sont: ADALTIS VIH 1+2 Ag/AC.

Les tests utiliser au niveau de l'IPA sont: WANTAI VIH 1+2 Ag/AC ELISA, ARCHITECT CMIA (4^{ème} génération), il y a d'autres méthodes pour d'autres marques de kits.

Matériel et Méthode

Ces kits détectent à la fois la présence d'anticorps anti VIH-1 et VIH-2 dans le sang du patient en plus de l'antigène p24 spécifique du virus du Sida.

2.3.1 ADALTIS VIH 1+2 Ag/AC

Le test à été fait sur 32 échantillons.

2.3.1.1 Matériels utilisé

Ce type de test est constitué de microplaquette et de réactifs (voir figures 19 et 20)



Figure 19: le kit



figure 20: microplaquette (96puits)

La composition des différents réactifs utilisés est:

Contrôle négatif

Contient le sérum humain négatif des anticorps de VIH et de l'antigène p24 et proclin 300 comme conservateur (ProClin 300 est une solution visqueuse contenant de 93 à 95% de glycol modifié et de 2 à 3% de carboxylate d'alkyle). Ce conservateur agit sur le cycle de Krebs chez les cellules en inhibant certaines fonctions enzymatiques. Lorsque le métabolisme cellulaire est affaibli, les micro-organismes perdent rapidement leur capacité à produire de l'ATP et à exercer des fonctions vitales, telles que la transcription, la traduction et la réparation des dommages. Toutes les bactéries et tous les champignons possèdent au moins certaines parties du cycle de Krebs. Les conservateurs ProClin représentent donc un biocide à large spectre hautement efficace.

Contrôle positif VIH-1

Contient le sérum humain positif pour anti-VIH-1 et proclin 300 comme conservateur.

Contrôle positif VIH-2

Contient de sérum humain positif pour anti-VIH-2 et proclin 300 comme conservateur.

Contrôle positif p-24

Contient recombinant p24 VIH-1 et proclin 300 comme conservateur.

Conjugué 1

Contient un mélange d'antigènes biotinylés dans un tampon phosphate et proclin 300 comme conservateur.

Conjugué 2

Contient la peroxydase de raifort conjugué à la streptavidine dans du tampon de stabilisation spécifique avec proclin 300 comme conservateur.

Substrat TMB

Contient le tétraméthylbenzidine (TMB) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans un tampon citrate.

Solution d'arrêt.

Contient une solution de H_2SO_4 qui a pour rôle d'arrêter la réaction avec entre la peroxydase et le TMB.

Solution de lavage

La solution prête à l'emploi est concentrée 25X. Son utilisation est à la concentration 1X après dilution avec de l'eau distillée

2.3.1.2 Méthode

Le protocole utilisé dans notre travail peut être décrit par les étapes suivantes sur 33 échantillons.

- Placer le nombre requis de micropuits dans le support de cupule
- Laisser le 1^{er} puits (A1) vide.
- Distribuer 100 μ l de diluant pour échantillon dans chaque puits sauf le puits pour l'exploitation de suppression
- Ajouter 100 μ l de contrôles négatifs dans les puits(B1), (C1) et (D1).(Le but d'avoir trois contrôles négatifs c'est parce que la valeur seuil doit être calculé avec la moyenne des trois négatifs et si un des trois se contamine on utilisera les deux qui restent pour calculer la valeur seuil)
- Ajouter 100 μ l de contrôles positifs de VIH1/2 et P24 dans les puits (E1, F1, G1).
- Ajouter 100 μ l de l'échantillon dans le nombre requis des puits (voir tableaux 1).
- Couvrir la microplaque avec le scellant et Incuber pendant 60 min à 37C.
- Laver la plaque pendant cinq cycles.

Matériel et Méthode

- Ajouter 200 µl de conjugué 1 dans chaque puits, sauf le 1^{er} puits (A1), couvrir et incuber pendant 30min
- Laver la plaque pendant trois cycles.
- Ajouter 200 µl de conjugué 2 dans chaque puits, sauf le 1^{er} puits (A1), couvrir et incuber pendant 30min.
- Laver la plaque pendant cinq cycles.
- Ajouter 150 µl de substrat TMB dans chaque puits de la plaque (inclus A1), couvrir et incuber pendant 30min.
- Distribuer 100 µl de solution d'arrêt dans tous les puits.
- Les résultats sont lus grâce au lecteur et pourront être imprimés

Tableau 3: Disposition des échantillons du test ADALTIS VIH 1+2 Ag/Ab

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanc	S2	S10									
B	NC	S3	S11									
C	NC	S4	S12									
D	NC	S5										
E	PC1	S6										
F	PC2	S7										
G	PC3	S8										
H	S1	S9										

CN= contrôle Négatif

CP1= contrôle positif VIH-1 CP2=contrôle positif VIH-2

CP3= contrôle positif VIH p-24 S= sérum (des patients)

Calcul du seuil

Les valeurs données par le lecteur sont comparées à une valeur seuil qui est calculée de la manière suivante:

Contrôle négatif (CN)= (DO B1+ DO C1+DO D1)/3

Valeur seuil= (CN– DO450nm (puits blanc A1)) + 0.170

On soustrait la densité optique du puits blanc pour éliminer celle du substrat et de la solution d'arrêt.

2.3.2 ELISA combinée WANTAI VIH 1+2 Ag/AC

2.3.2.1 Matériel utilisé

Dans ce cas aussi il y a eu utilisation de kits constitués de plaques et de réactifs (voir figures 21 et 22).



Figure 21: le kit



Figure 22: la microplaque de 96 puits

La composition des différents réactifs utilisés pour **WANTAI** est:

Contrôle négatif

Contient le sérum humain négatif des anticorps de VIH et de l'antigène p24 et un conservateur.

Contrôle positif VIH-1

Contient du sérum humain positif pour anti-VIH-1 et un conservateur.

Contrôle positif VIH-2

Contient du sérum humain positif pour anti-VIH-2 et un conservateur.

Contrôle positif p-24

Contient recombinant p24 VIH-1 et conservateur.

HRP-conjuguée

Contient un antigène recombinant du VIH 1+2 conjugué à la peroxydase de raifort conjugué à l'avidine.

Biotine-conjuguée

Contient anticorps p24 biotinylés anti-VIH dilués dans un tampon stabilisé en protéines.

Solution de chromogène A

Contient le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Solution de chromogène B

Contient le tétraméthylbenzidine (TMB)

Matériel et Méthode

Préparation de la solution

Les puits							
A	B	C	D	E	F	G	H
20µl de biotine conjuguée							
	100 µl de contrôle négative	100 µl de contrôle négative	100 µl de contrôle négative	100 µl de contrôle positive de VIH-	100 µl de contrôle positif HIV-2	100 µl de contrôle positif P- 24	100 µl de sérum
incubation (37 °C /60min)							
Lavage 5 fois pendant 30s-60s							
	100 µl de HRP-conjugué						
incubation (37 °C /30min)							
Lavage 5 fois pendant 30s-60s							
50 µl desolution de chromogène A							
50 µl desolution de chromogène B							
incubation (37 °C /15min)							
50µl de la solution stop							

Tampon de lavage concentré X20.

Le Protocole utilisé dans notre travail peut être décrit par les étapes décrites dans le tableau 4 sur les deux échantillons patients 1 et 2:

Tableau 4: descriptif de la réalisation du test WANTAI

Les résultats lus par le lecteur sont comparés à une valeur seuil qui est calculée de la manière suivante.

$$\text{Contrôle négatif (CN)} = (B1+C1+D1) / 3$$

$$\text{La valeur seuil} = \text{CN} + 0.12$$

2.4 ARCHITECT

Le test **ARCHITECT VIH Ag/AC** permet un dosage immunologique en deux étapes pour la détermination de la présence de l'antigène p24 du VIH et des anticorps anti-VIH-1 (groupe M et O) et anti-VIH-2 dans le sérum ou le plasma humain, utilisant la technologie immunologique microparticulaire par chimiluminescence (CMIA) avec les protocoles de dosage flexible, appelés chemiflex.

2.4.1 Matériels utilisés pour ARCHITECT

Matériel et Méthode

Ce test est assez différent des autres tests. En effet il dispose d'un matériel spécifique (figures 23 et 24) et nécessite un mode de lecture spécifique.



Figure 23: ARCHITECT



Figure 24: le portoir avec les échantillons

La composition des différents réactifs utilisés pour **ARCHITECT** est:

- **Microparticules:** recouvertes d'antigène VIH-1 / VIH-2 (recombinant) et d'anticorps anti-p24 du VIH.
- **Conjugué:** conjugué d'antigènes VIH-1 (recombinants), il s'agit de peptides synthétiques VIH-1/VIH-2 et d'anticorps anti-p24 du VIH.
- **Assay diluent:** diluant du dosage VIH Ag/AC combo contenant du tampon TRIS et comme conservateur l'azide de sodium.
- Solution de préactivation contenant 1,32% d'eau oxygénée.
- Solution d'activation contenant de l'hydroxyde de sodium.
- Tampon de lavage contenant une solution saline tamponnée au phosphate.

2.4.2 Méthode

Les étapes suivies pour la réalisation de ce test sont les suivantes:

- Séparer le caillot ou les globules rouges par centrifugation.
- Charger les échantillons dans l'analyseur.
- homogénéiser les microparticules et utiliser les kits de réactif sur l'analyseur.
- Le dosage par ARCHITECT VIH Ag /AC combo est réalisé après introduction des échantillons dans l'analyseur.
- Lire les résultats obtenus grâce à l'ordinateur (ERGOTRON) intégré au lecteur.

2.5 Le test WESTERN BLOT

Les bandelettes de nitrocellulose sont sensibilisées par des protéines antigéniques, séparées par électrophorèse et fixées, à partir du virus VIH-1 inactivé et partiellement purifié, puis incorporées à l'aide d'un transfert (blotting). Un peptide de synthèse spécifique du VIH-2 est ajouté sur ces mêmes bandelettes.

Chaque bandelette de nitrocellulose est incubée avec le sérum ou le plasma dilué et avec les contrôles. Les anticorps spécifiques au VIH-1 et VIH-2, s'ils sont présents dans les échantillons, se lieront aux protéines VIH-1 et au peptide VIH-2 des bandelettes. Les substances non liées sont ensuite éliminées par lavage des bandelettes. Les anticorps fixés spécifiquement sur les protéines. Cette méthode est suffisamment sensible pour détecter de très faibles quantités d'anticorps spécifiques au VIH dans le sérum ou le plasma.

2.5.1 Matériels

Le matériel utilisé est présenté en figures (25,26 et 27).

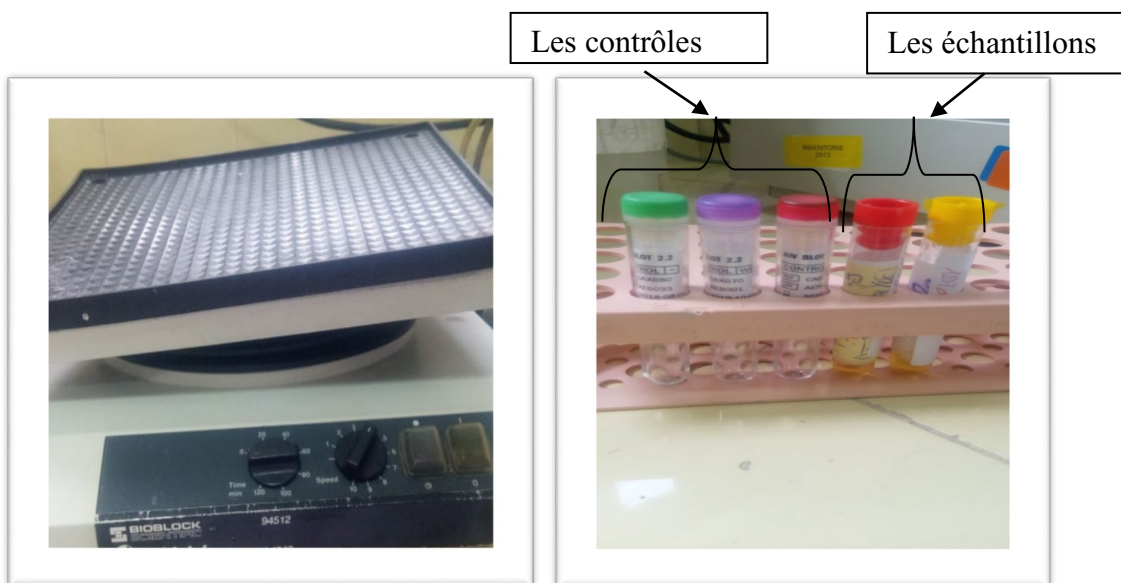


Figure 25: le plateau à bascule(original)

Figure 26: les contrôles et les échantillons(original)

Matériel et Méthode

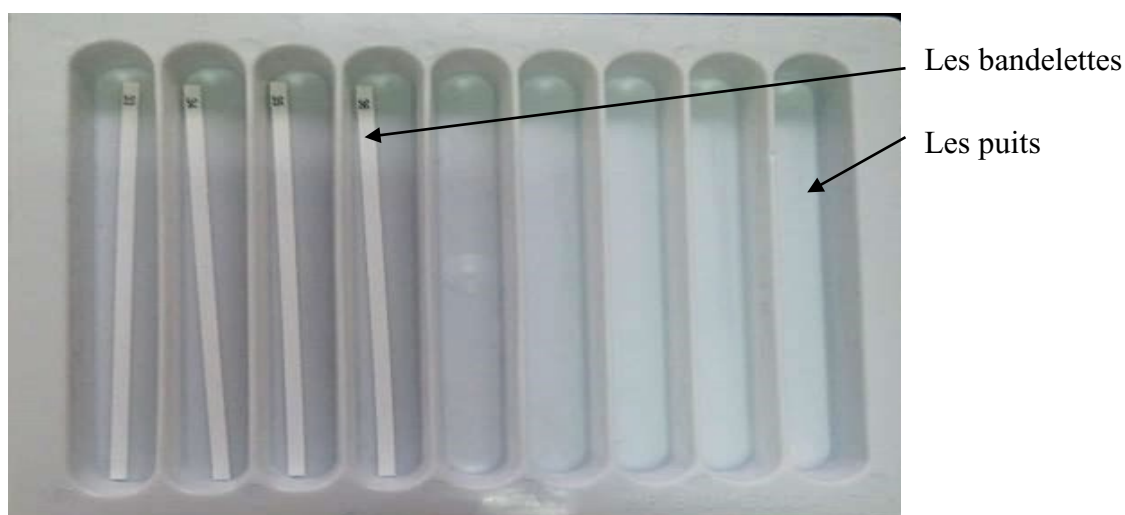


Figure 27: les puits

En plus des deux bandelettes correspondant à chacun des patients trois autres doivent être utilisées comme contrôles avec un contrôle négatif, un contrôle positif fort et un contrôle positif faible.

La composition des différents réactifs utilisés pour **VIH BLOT** est:

- **Contrôle négatif**

Aucune bande spécifique au VIH-1 ou au VIH-2 ne doit apparaître sur les bandelettes de contrôle négatif. La bande correspondant au contrôle du dépôt sérique doit être visible.

- **Contrôle positif fort**

Contient les protéines p17, p24, p31, gp41, p51, p55, p66, gp120/gp160 de VIH-1 et p55 du VIH-2.

- **Contrôle positif faible**

Il permet de mesurer la sensibilité du kit. Des bandes peu marquées doivent apparaître en p24 et ou gp41 et gp120/gp160. D'autres bandes peu marquées peuvent être ou non présentes.

2.5.2 Méthode

Le Protocole utilisé dans notre travail peut être décrit par les étapes présentées dans le tableau 3. Ce test a été effectué pour les échantillons des patients 3 et 4 sur un deuxième prélèvement, puisqu'ils avaient déjà fait les tests ELISA (marque BIORAD, ADALTIS) et ARCHITECT au niveau de l'IPA, mais leurs résultats étaient douteux.

Matériel et Méthode

Tableau 5: descriptif de la réalisation du test WESTERN BLOT

Les puits				
CN	CP FORT	CP Faible	P3	P4
2 ml de tampon de lavage dilué				
Bandelette				
incubation 1 à 2 minutes sur un plateau à bascule				
Aspiration pour éliminé le tampon				
2 ml de tampon de blotting				
20µl de contrôle négative	20µl de contrôle faible positif	20µl de contrôle fort positif	20µl de sérum 1	20µl de sérum 2
Incubation tout la nuit				
2 ml de tampon de lavage dilue pendant 5 min				
2 ml de solution de conjugue				
Incubation 30 min				
Aspiration et lavage pendant 5 min				
2 ml de solution de substrat				
Incubation pendant 15 minutes sur le plateau à bascule				
Aspiration du substrat				
Rincer les bandelettes au l'eau distillée pour d'arrêter la réaction				

CN: contrôle négatif CP fort: contrôle positif fort CP faible: contrôle positif faible

Attendre que les bandes noires apparaissent.

Le résultat apparaîtra sous forme des bandes correspondant à des protéines virales. Le résultat est lu par comparaison avec une bandelette témoin présentant toutes les protéines et qui se trouve dans le kit (voir figure suivante).

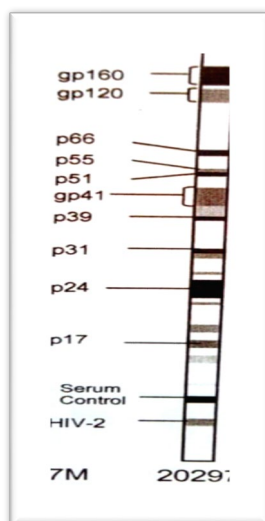


Figure 28: bandelette témoin

2.6 Evaluation de la charge virale par la PCR en temps réel VIH-1

Avant la réalisation de la technique de la PCR en temps réel afin d'évaluer la charge virale du VIH chez le patient 5, une extraction du génome viral a été réalisée à partir du sérum du patient.

2.6.1 Matériel

Etant donné que ce type de test nécessite l'utilisation de deux techniques, l'extraction du génome virale à partir des échantillons des patients suivie par la PCR en temps réel, plusieurs appareils sont utilisés voir figures (29, 30,31, 32, 33, et 34).



Figure 29: Thermocycleur pour PCR-en temps réel

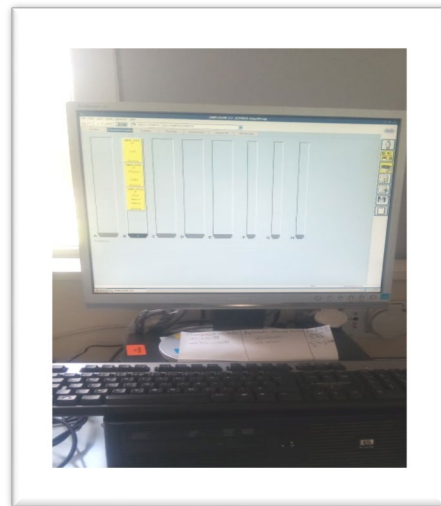


Figure30 : Ordinateur avec logiciel



Figure 31: les cassettes sur les portoirs

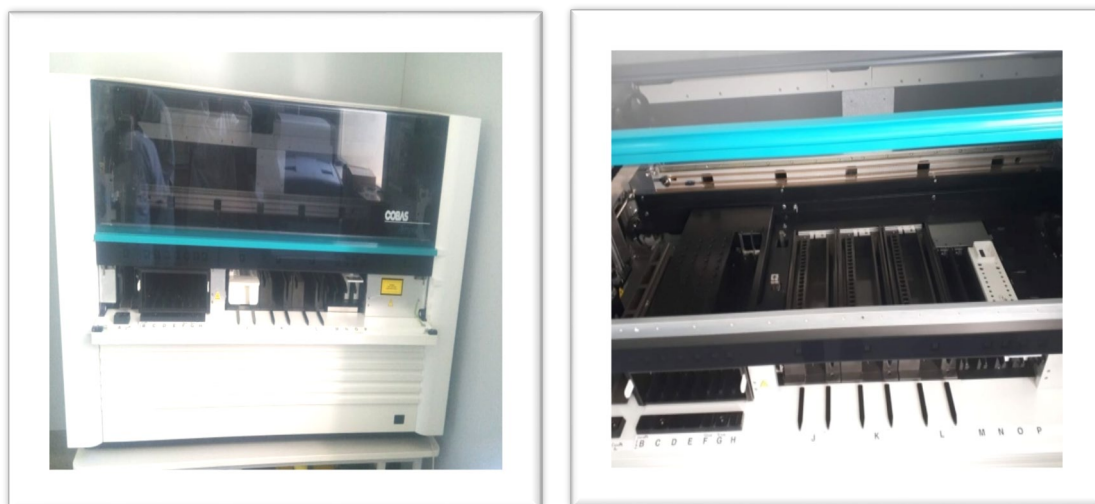


Figure 32: automate d'extraction d'Acides Nucléiques COBAS AmpliPrep®

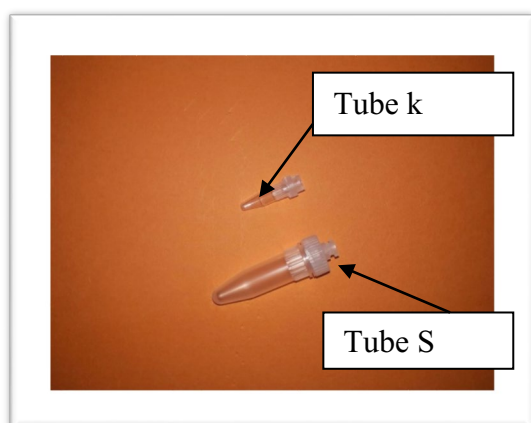


Figure 33: les tubes k et S



Figure 34: SPU

Réactifs

Tous les réactifs sont fournis dans quatre cassettes au total, qui sont elles mêmes, portées par des portoirs. Un premier portoir porte une seule cassette tandis que le deuxième porte les trois autres cassettes.

La cassette CS1: c'est la cassette de réactifs de particules de verres magnétiques et d'une solution d'isopropanol à 93%.

La cassette CS2: c'est la cassette de réactif de lyse. Elle contient du dihydrate de citrate de sodium, du thiocyanate de guanidine à 42,5%, du polydocanol à moins de 14% et du dithiothréitol à 0,9%.

La cassette CS3: c'est la cassette de multi réactifs, contenant une solution de protéinase et un tampon d'élution.

La cassette CS4: c'est la cassette de réactifs spécifiques au test VIH-1, elle contient :

Matériel et Méthode

- Le standard de quantification QS du VIH-1: c'est un RNA non infectieux contenant des séquences de liaison aux amorces VIH-1 et un site unique de liaison à la sonde.
- Le master-mix: c'est le mélange réactionnel VIH-1. Le master-mix est constitué des déoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dUTP, dTTP), les amorces sens et anti-sens pour la région gag du VIH-1, les sondes oligonucléotidiques à marque fluorescente spécifiques du VIH-1 et du QS, l'ADN polymérase, l'enzyme Ampérase (Uracile-N-glycosylase) et de l'azide de sodium.
- Une solution de sel de manganèse qui sert de tampon.
- Le réactif de lavage

Les réactifs sont conservés entre 2 et 8°C.

Témoins

Les témoins assurent un contrôle interne lors du test, ils sont constitués d'ARN non infectieux et sont de 3 types:

- Le témoin négatif (CN)
- Le témoin faiblement positif (LPC)
- Le témoin fortement positif (HPC)

Les témoins sont conservés à des températures comprises entre 2 et 8°C.

2.6.2 Méthodes

Afin d'évaluer la charge virale du VIH dans le sérum d'un patient on réalise d'abord l'extraction du génome puis son amplification pour la quantification par la PCR en temps réel.

2.6.2.1 Extraction d'ADN

L'instrument COBAS AmpliPrep Réalise la préparation automatisée des échantillons. Pour cela, l'extraction de l'ARN du VIH-1 s'effectue selon quatre étapes à des températures d'incubation différentes:

- La lyse des particules virales grâce à un tampon de lyse, les acides nucléiques sont ainsi libérés, ils sont ensuite stabilisés et déprotéinisés.
- La capture des acides nucléiques par les particules magnétiques en verre.
- Le lavage des acides nucléiques par élimination des substances et des impuretés non liées.
- la purification des acides nucléiques.

Matériel et Méthode

L'ensemble de ce processus s'effectue au bout de 2h30-3h de temps de manière automatisée, par les étapes suivantes:

Charger les cassettes CS1 sur un portoir (Rack) en position A, et CS2, CS3 et CS4 sur un autre portoir en position B, C, D ou E (mise à température ambiante dans l'appareil au moins 30 minutes avant le traitement du premier échantillon).

Les échantillons sont sortis du congélateur et placés à la température ambiante jusqu'à décongélation. Et Transférer 1000 à 1050 µl de sérum et les contrôles dans les tubes S et Charger le portoir des échantillons en position F, G ou H...

Charger le portoir des SPU (SampleProcessing Unit) en position J, K ou L, l'extracteur prendra le sérum et les réactifs de la lyse et les mettra dans les SPU pour libérer et capter le génome viral par les microparticules.

Charger le portoir des embouts K en position M, N, O ou P pour chaque échantillon et contrôle. L'extracteur ajoutera le master mix (produit d'extraction et les réactifs d'amplification).

Créer une liste de travail à l'aide du logiciel.

Lancer l'extraction en appuyant sur START.

Après extraction, les échantillons se trouvant sur le K-carrier sont transférés dans le thermocycleur A ou B du COBAS TaqMan pour amplification et détection.

2.6.2.2 PCR en temps réel

Le principe de la méthode est la quantification qui repose sur la RT-PCR en Temps Réel c'est-à-dire une PCR réalisée sur un ADN obtenu après retro transcription de l'ARN grâce à la transcriptase inverse. La PCR en temps réel (ou real time PCR ou PCR quantitative) suit les mêmes étapes que la PCR classique, c'est-à-dire une succession de cycles de dénaturation-hybridation-extension. A la différence d'une PCR classique, la PCR en temps réel utilise des sondes fluorescentes marquées qui permettent la quantification et la caractérisation de l'amplicon formé en temps réel. Les signaux fluorescents ainsi émis sont collectés pour chaque échantillon à chaque cycle de PCR et sont proportionnels à la quantité des gènes amplifiés.

Le master-mix doit être transféré dans le thermocycleur (COBAS TaqMan® 48) afin de quantifier le génome viral, pour cela les étapes sont comme suit:

- Transcription inverse de l'ARN cible pour générer un ADN complémentaire (ADNc).
- L'amplification est constituée de trois phases:

Matériel et Méthode

Dénaturation: c'est une étape de chauffage à 95°C.

Hybridation: cette étape est généralement à 56-64°C.

Elongation: cette étape est généralement à 72°C.

Au cours de la réaction d'amplification, l'ARN cible est converti en ADN grâce à l'activité de transcription inverse de la polymérase thermostable rTth ADN. En premier lieu, les amorces de transcription inverse du VIH-1 et du contrôle interne s'hybrident avec leurs cibles respectives et s'étendent au cours d'une période d'incubation prolongée. Après l'étape de dénaturation, au cours de laquelle la température de la réaction s'élève au-dessus du point de fusion du produit ADNc double brin/ARN, une deuxième amorce s'hybride avec le brin de ADNc et s'étend sous l'activité de la polymérase de l'ADN de l'enzyme rTth afin de créer un produit d'ADN à double brin.

- La Détection:

Pendant les cycles de lecture de l'amplification, la température est encore abaissée de manière à permettre la détection par fluorescence des produits d'amplification au cours de l'hybridation des sondes VIH-1 et du contrôle interne avec leurs cibles (détection par fluorescence en temps réel). La sonde VIH possède une fraction fluorescente liée de manière covalente à l'extrémité 5'. Un oligonucléotide court (Quencher) est complémentaire de l'extrémité 3' de la sonde VIH-1 et possède une molécule de désactivation à son extrémité 5'. En l'absence de cible VIH-1, la fluorescence de la sonde VIH-1 est désactivée par son hybridation au "quencher". En présence d'une séquence cible VIH-1, la sonde VIH-1 s'hybride de préférence avec la séquence cible, la dissociant du "quencher" et permettant ainsi la détection de la fluorescence.

3. résultats et discussion

3.1. Descriptif des tests de détection du VIH dans notre étude

Durant notre stage pratique, au niveau de l'EPH nous avons effectué des tests sur 33 patients, 32 d'entre eux portant les codes de P1 à P32, ont été soumis à un test se basant sur la sérologie enzymatique, et un patient P33 a fait l'objet d'un test rapide et un test enzymatique. Concernant l'IPA nous avons effectué des tests sur 5 patients comme suit, un test rapide et deux tests ELISA pour deux patients P'1 et P'2, le test western blot pour deux autres patients P'3 et P'4. Un dernier test d'évaluation de la charge virale par RT-PCR a été effectué pour le patient P'5.

- Les patients de P1 à P32, sont des donneurs de sang, le patient P33 était hospitalisé au service pneumologie.
- Les deux patients P'1 et P'2 qui ont été envoyés au niveau de l'IPA, ont déjà fait le dépistage au niveau du laboratoire de leur localité d'habitation.
- Les patients P'3 et P'4 ont fait les tests ELISA au niveau de l'IPA, mais leurs résultats étaient douteux pour cela ils ont été soumis au diagnostic par Western blot.
- Le dernier cas, le patient P'5 est sous un traitement médicamenteux dont l'efficacité est évaluée par la RT-PCR.

3.1 Présentation de l'échantillon des patients de l'EPH

Les patients ayant fait l'objet du diagnostic du VIH à l'EPH sont au nombre de 33 avec une minorité de femmes et appartiennent à différentes tranches d'âge de 19 ans à 51 ans.

3.1.1 Présentation de l'échantillon Selon le sexe

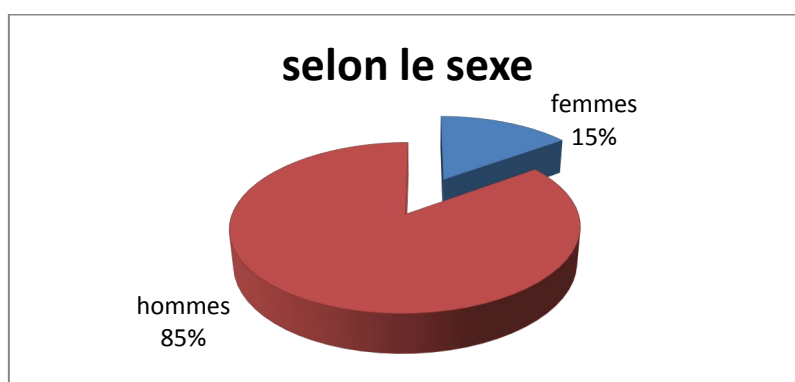


Figure 35: Proportions des patients selon le sexe

Résultats et Discussion

Cet échantillon de patients est constitué de 15% de femmes et 85% d'hommes. Ceci peut être expliqué par le fait que les patients de ce groupe sont en majorité (P1 à P32) des donneurs de sang parmi lesquels il y dans notre pays une majorité d'hommes. Cet échantillon n'est pas représentatif de la population algérienne dont les proportions sont de 50% pour chacun des sexes.

3.1.2 Présentation de l'échantillon Selon l'âge

Nous avons opté pour le classement des individus dans des tranches d'âge par décennies

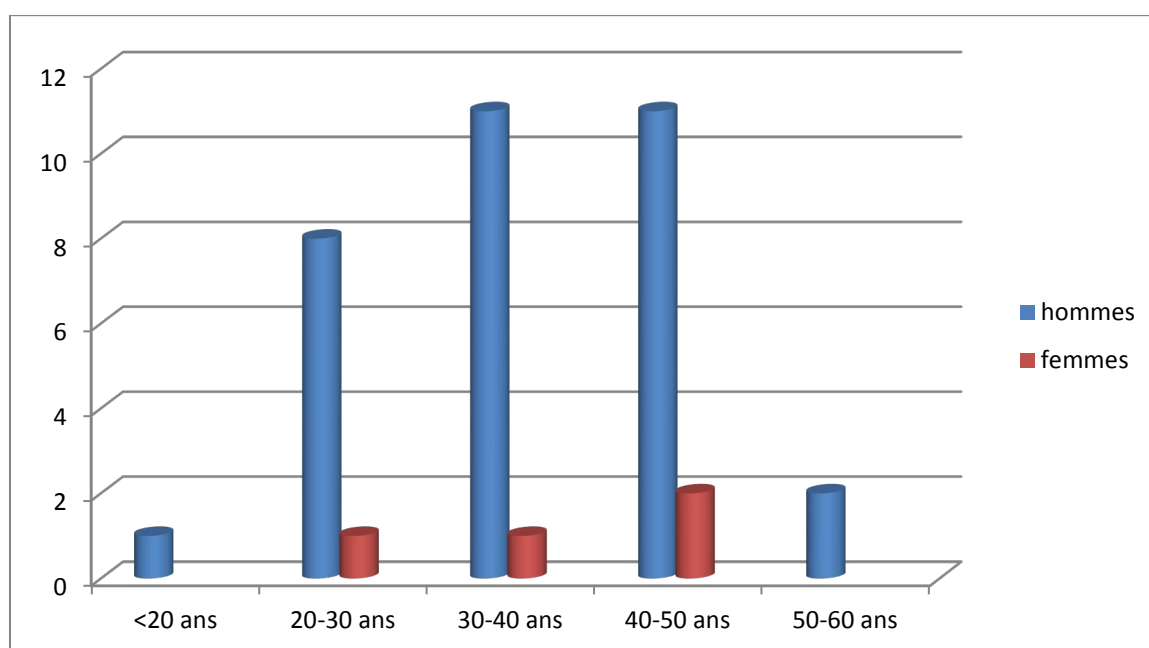


Figure36: Proportions des patients selon l'âge

La tranche d'âge qui comporte le moins de patients est celle des moins de 20 ans alors que les tranches correspondant au plus d'individus sont situées entre 30-40 ans et 40-50 ans. En effet le don de sang ne peut être effectué qu'à partir de 18 ans et pas au delà de 70 ans.

3.2 Détection du VIH par Test rapide

Le test rapide est un test, indirect et réalisé grâce à des bandelettes imprégnées d'antigènes du VIH-1 et VIH-2 qui permettent de détecter des anticorps anti VIH dans le sérum des patients(Figure 37).

Résultats et Discussion

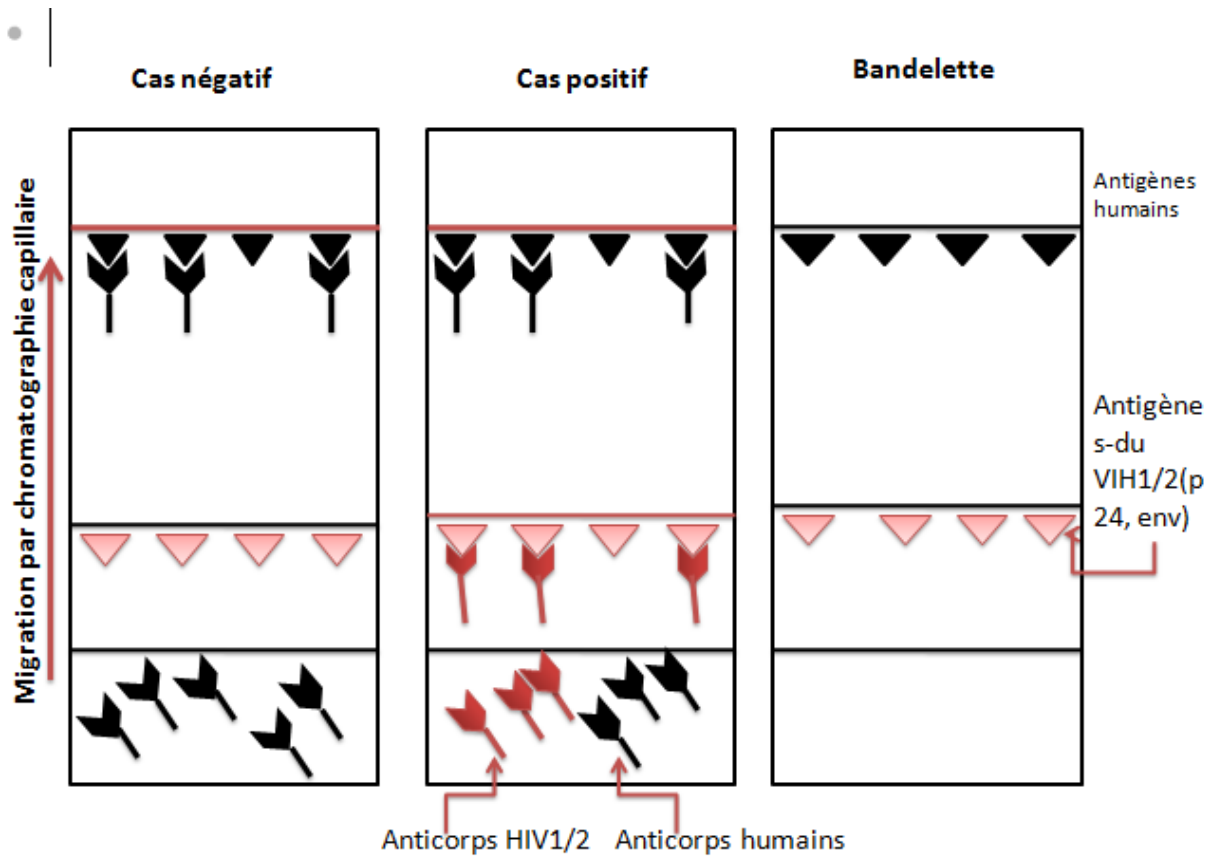


Figure 37: principe du test rapide

Ce test a été effectué chez deux patients P'1 et P'2 pour confirmer le diagnostic de P33 qui a été dirigé par son médecin traitant parce qu'il a observé des symptômes en relation avec l'infection au VIH. La figure 38 montre l'aspect de résultats obtenus.

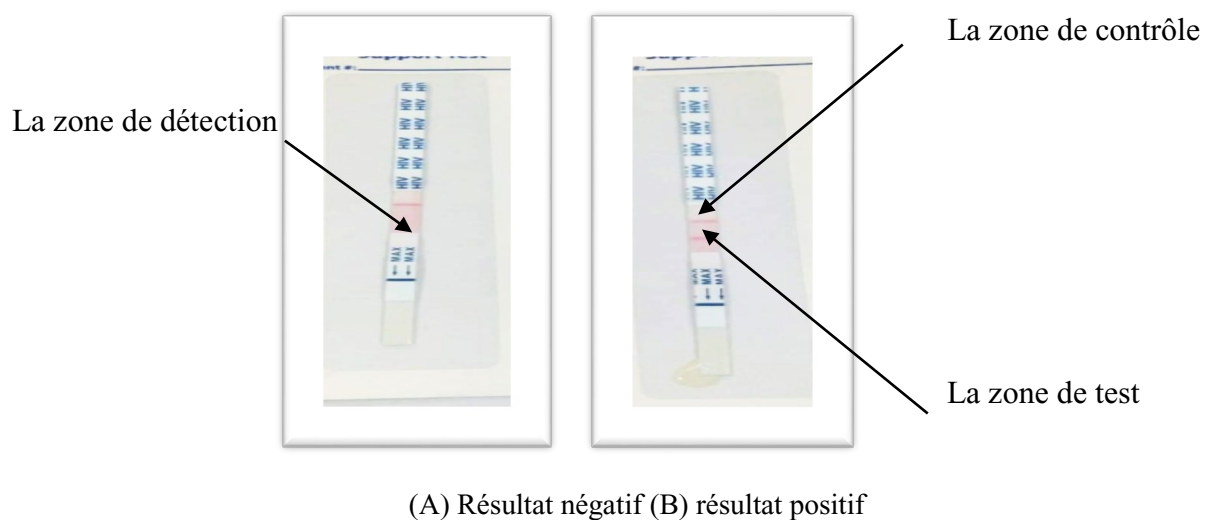


Figure 38: Aspect des résultats du test rapide

Résultats et Discussion

Un résultat positif s'exprime par la présence de deux bandes de coloration rose et l'intensité de la coloration dans la zone de test dépend de la concentration d'anticorps, alors que pour un résultat négatif on observe une seule bande toujours de coloration rose.

Le patient P'1: présente un résultat négatif parce que nous n'avons observé qu'une seule bande sur la bandelette.

Les patients P'2 et P33: présentent un résultat positif parce que nous avons observé deux bandes sur la bandelette.

Le test avec les bandelettes VIH-1 et VIH-2 est un test rapide qui permet la détection qualitative des anticorps dirigés contre le VIH-1 et/ou VIH-2, facilitant ainsi le diagnostic des infections au VIH. Ce test est réservé exclusivement à un usage de diagnostic professionnel, cependant il n'est pas très fiable. En effet par ce test des résultats du type faux positifs et faux négatifs peuvent être obtenus. Les résultats faux négatifs sont dus au fait que du jour 0 aux 20-21^{ème} jours, il s'agit de la période de séroconversion c'est-à-dire la fenêtre ou période entre le jour de la contamination et le moment de l'apparition des anticorps dans le sang. De plus nous savons qu'il faut une période de 3 mois pour produire des anticorps à des taux pouvant être détectés par ce test. Ce qui signifie que le résultat du test rapide, donne une certitude uniquement concernant la période antérieure aux 3 derniers mois.

Ce mode de diagnostic donne aussi des résultats du type faux positif, par une erreur de l'utilisateur telle qu'une mauvaise interprétation, contamination croisée entre les échantillons de sang, et réactivité sérologique non spécifique/interférence (**Klarkowski, 2014**).

Pour toutes les raisons citées ci-dessus, le test rapide n'est pas très fiable. Pour cela, nous avons utilisé le test ELISA combiné (4^{ème} génération qui est un test très amélioré et assez sensible pour donner des résultats fiables).

3.3 Test ELISA

Le test ELISA est un test spécifique, essentiellement indirect. Ce type de tests est réalisé grâce à une microplaque qui détecte les anticorps dirigés contre le VIH-1 et le VIH-2 mais aussi l'antigène P24, même s'ils sont à une faible concentration. Dans notre travail trois types de tests ELISA appartenant à trois marques différentes par la nature de leurs réactifs et leurs nombres mais aussi par le protocole de réalisation.

3.3.1 Test ELISA ADALTIS

Les antigènes représentant des épitopes, gp41 du HIV-1 et gp36 du HIV-2 sont fixés dans des puits de la microplaque, dans d'autres puits ce sont des anticorps monoclonaux dirigés contre le HIV-1 et p24 qu'on va trouver. Si les anticorps spécifiques pour le HIV-1 et/ou HIV-2 (IgG, IgM ou IgA) et l'antigène p24 sont présents dans l'échantillon, des complexes (AC/Ag) stables se forment.

Les complexes antigène-anticorps stables sont identifiés par l'addition successive d'antigènes biotinylés et la peroxydase de raifort (HRP) conjuguée à la streptavidine. Ces complexes anticorps-antigène sont quantifiés par l'activité catalytique de la peroxydase de raifort. La solution de substrat de la peroxydase est ajoutée et est converti en un produit de couleur bleue.

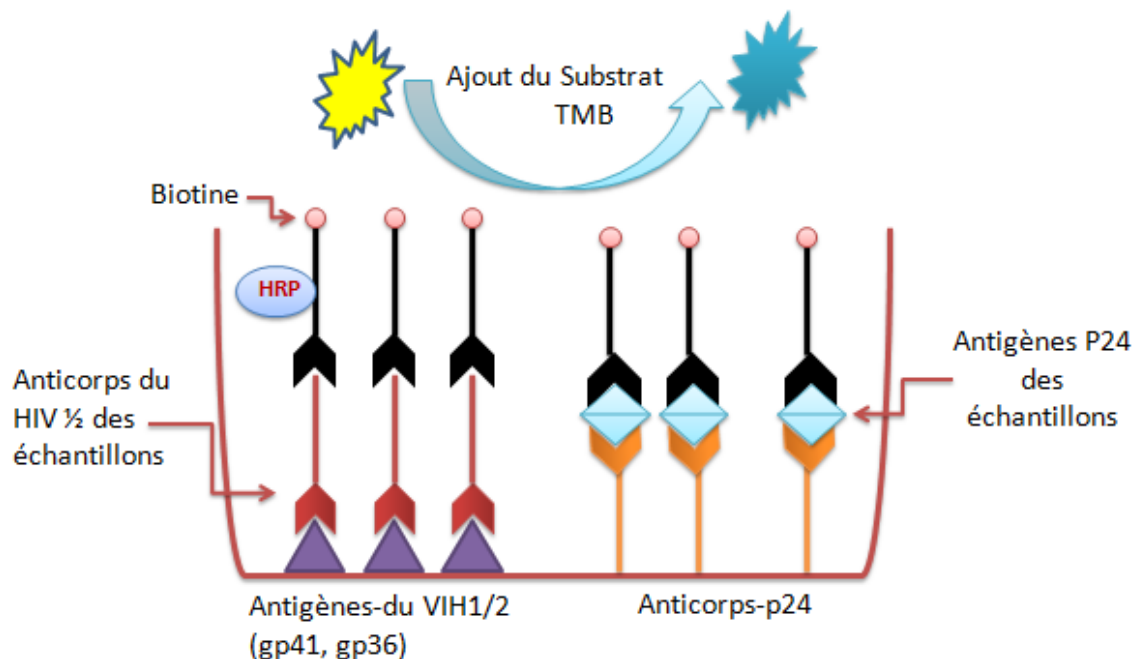


Figure 39: Principe du testADALTIS

Ce test a été effectué au niveau de l'EPH chez 32 donneurs de sang P1- P32 et pour la confirmation du résultat du patient P33. Le tableau 6 représente les résultats comparatifs des densités optiques.

Chaque valeur seuil correspond à une analyse des échantillons au temps T.

Résultats et Discussion

Dans notre cas les résultats ont été obtenus en 4 analyses différentes réalisées en 4 temps différents pour cela nous nous retrouvons face à 4 valeurs seuil. Chacune de ces valeurs servira de comparatif pour les échantillons analysés au même moment.

Exemple de calcul de la valeur seuil:

$$\text{Contrôle négatif (CN)} = (\text{DO B1} + \text{DO C1} + \text{DO D1}) / 3$$

Si la valeur moyenne est supérieure ou égale à 0.100 le terme doit être répété.

$$\text{Cut-off (CO)} = (\text{CN} - \text{DO450nm (puits blanc)}) + 0.170$$

$$\text{CN} = 0.020 + 0.018 + 0.017 / 3$$

$$\text{CN} = 0.018$$

$$\text{Valeur seuil} = (0.018 - 0.028) + 0.170$$

$$\text{Valeur seuil} = 0.160$$

Pour les autres valeurs seuil le même calcul a été fait.

Si La valeur de l'absorbance pour un patient est inférieure à la valeur seuil le résultat est estimé comme non réactif c'est à dire négatif.

Si La valeur de l'absorbance est supérieure à la valeur seuil le résultat est estimé comme réactif donc positif.

Pour **les patients P1-P32**: les résultats sont négatifs parce que les valeurs de l'absorbance sont inférieures aux valeurs seuil.

Patient P33: Le résultat est positif parce que la valeur de l'absorbance est supérieure à la valeur seuil.

Au niveau de l'EPH les analyses des prélèvements de sang qui ont été effectuées par le test immuno-enzymatique ADALTIS présentent deux situations:

Résultats non réactifs: ils sont reportés négatifs parce que ce test est sensible. Il permet la détection d'un minimum d'anticorps et d'antigènes dans le sérum, comme le cas des donneurs de sang P1-P32.

Résultat réactif: il y a lieu d'effectuer un deuxième test de type immuno-enzymatique sur le même prélèvement et ceci est au niveau de l'IPA comme le cas du patient hospitalisé P33.

Résultats et Discussion

Tableau6: Résultats du test ELISA ADALTIS

LES PATIENTS	SEXE	Densité optique	Valeur seuil
P1	Homme	0.006	Â0.155
P2	Homme	0.007	
P3	Femme	0.002	Â0.215
P4	Femme	0.003	
P5	Femme	0.005	
P6	Femme	0.143	Â0.117
P7	Homme	0.113	
P8	Homme	0.091	
P9	Homme	0.036	
P10	Homme	0.029	
P11	Femme	0.018	
P12	Homme	0.025	
P13	Homme	0.029	
P14	Homme	0.009	
P15	Homme	0.018	
P16	Homme	0.029	
P17	Homme	0.026	
P18	Homme	0.028	
P19	Homme	0.020	
P20	Homme	0.020	
P21	Homme	0.027	
P22	Homme	0.013	
P23	Homme	0.023	
P24	Homme	0.022	
P25	Homme	0.025	
P26	Homme	0.020	
P27	Homme	0.016	
P28	Homme	0.013	
P29	Homme	0.014	
P30	Homme	0.018	
P31	Homme	0.021	
P32	Homme	0.020	
P33	Homme	3.215	

Résultats et Discussion

Ce type de test a été réalisé au niveau de l'IPA sur deux patients P'1 et P'2 de notre échantillon. Le tableau 7 représente la DO des contrôles (B jusqu'à G) et la DO des patients P'1 et P'2 (H).

Tableaux 7: Résultats du test ELISA WANTAI

patients échantillons	PATIENT1 (DO)	PATIENT 2 (DO)
A (blanc)	0.003	0.001
B (CN)	0.024	0.019
C (CN)	0.027	0.041
D (CN)	0.018	0.021
E (CP)	3.384	2.191
F (CP)	2.156	1.848
G (CP)	3.59	3.537
H (S)	0.008	3.485

CN: contrôle négatif, **CP:** contrôle positif, **S:** sérum

Calcul de la valeur seuil

Contrôle négatif (CN) = $(B1+C1+D1) / 3$

Valeur seuil = $CN + 0.12$

Patient P'1:

$CN = (0.024+0.027+0.018)/3=0.023$

Valeur seuil = $0.023+0.12=0.143$

Patient P'2:

$CN = (0.019+0.041 +0.021)/3=0.027$

$CO = 0.027+0.12=0.147$

Interprétation des résultats:

Lorsque la valeur de l'absorbance chez un patient est inférieure à la valeur seuil le résultat est considéré comme non réactif (négatif).

Lorsque La valeur de l'absorbance chez un patient est supérieure à la valeur seuil le résultat est considéré comme réactif (positif).

Lorsque La valeur de l'absorbance chez un patient est égale à la valeur seuil il faut refaire le test

Patient P'1: chez ce patient, le résultat est non réactif (négatif) parce que la valeur de l'absorbance est inférieure à la valeur seuil $0,008 < 0,143$.

Patient P'2: dans ce cas le résultat est réactif (positif) parce que valeur de l'absorbance est supérieure à la valeur seuil $3,485 > 0,147$.

Un seul test ELISA n'est pas suffisant pour confirmer les résultats obtenus, pour cela nous devons effectuer un deuxième test sur le même prélèvement comme cela est indiqué dans l'algorithme de diagnostic mais avec un principe différent ou support différent. Pour cela, nous avons utilisé le test Architect qui est un test automatisé, et très sensible.

3.3.3 ARCHITECT

Le test ARCHITECT HIV Ag/Ac combo permet un dosage immunologique dans le sérum ou le plasma humain pour la détermination de la présence de l'antigène p24 du VIH et des anticorps anti-VIH-1 (groupe M et O) et anti-VIH-2, utilisant la technologie immunologique microparticulaire par chimiluminescence (CMIA).

L'antigène p24 du VIH et les anticorps anti-VIH-1/VIH-2 présents dans l'échantillon se lient aux microparticules recouvertes d'antigènes VIH-1/VIH-2 et d'anticorps anti-p24 du VIH, après lavage l'antigène p24 du VIH et les anticorps anti-VIH-1/VIH-2 se lient aux conjugués marqués à l'acridinium, après un autres cycle de lavage, les solutions de pré-activation et d'activation sont ajoutés au mélange réactionnel. La réaction chimiluminescence qui en résulte est mesurée en unités relative de lumières (URL).

Résultats et Discussion

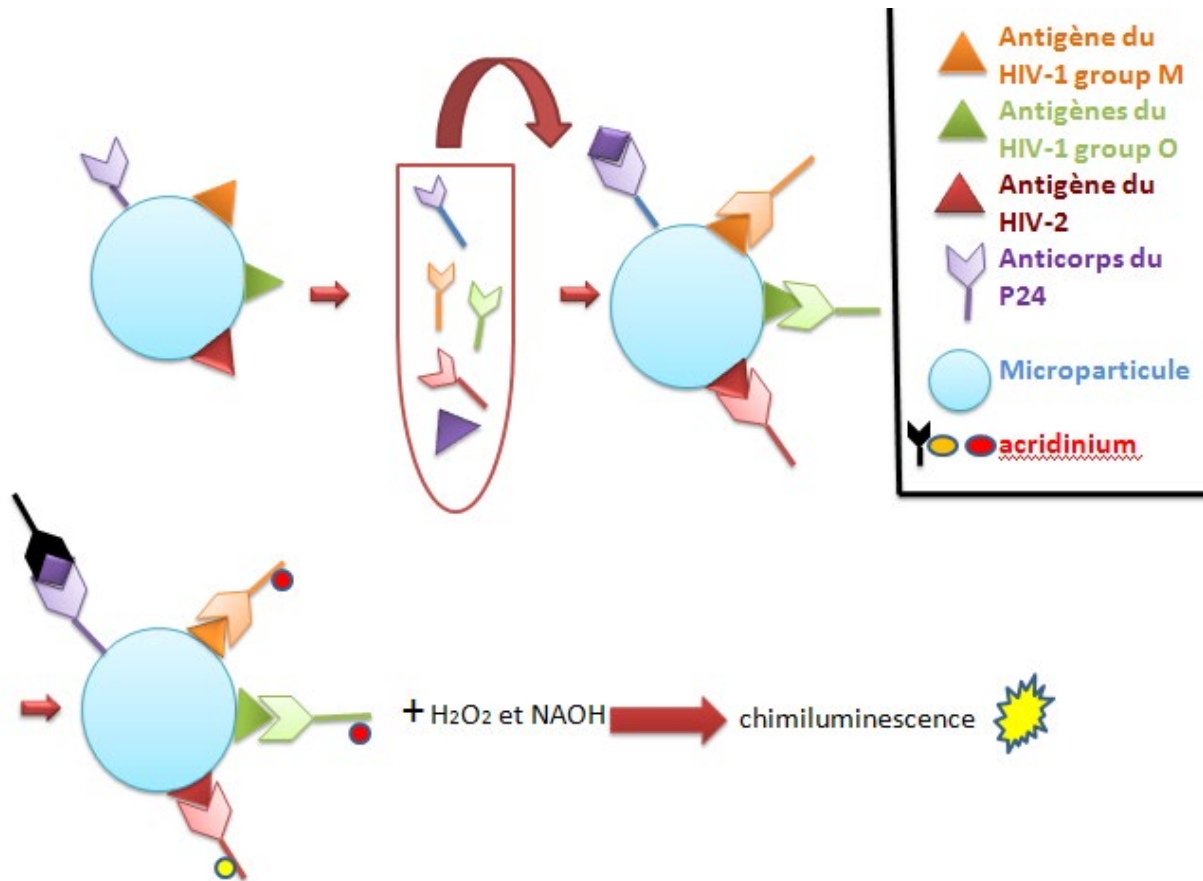


Figure 41: principe du test ARCHITECT

L'acridinium est représenté par trois symboles car il peut se comporter comme anticorps ou comme un antigène du VIH-1 ou du VIH-2.

Ce type de test a été effectué sur les deux patients P'1 et P'2. Le Tableau 8 montre les résultats obtenus.

Tableau 8: Résultats du test ARCHITECT

Patients	P'1	P'2
Paramètres		
RATIO	0.08 S/CO	1.71 S/CO
RESULTATS	Non réactif	Réactif

Interprétation des résultats:

Lorsque le ratio chez un patient est inférieur à 1 le résultat est considéré comme non réactif c'est à dire négatif.

Résultats et Discussion

Lorsque le ratio chez un patient est supérieur à 1 le résultat est considéré comme réactif c'est à dire positif.

Patient P'1: Le résultat est négatif.

Patient P'2: Le résultat est positif.

Nous remarquons qu'il y a une différence entre les deux résultats obtenus parce que les deux tests sont différents dans leurs principes, le test ELISA WANTAI est un test manuel (nous ne pouvons pas ajuster les mesures à la manipulation) ce qui nous donne un résultat qui est inexact. Par contre, le test ARCHITECT est un test automatisé (donne des mesures exactes) et nous donne un résultat précis.

Les tests ELISA combinés de quatrième génération seront utiles pour détecter une infection précoce, il détecte à la fois la présence d'anticorps anti-VIH-1 et VIH-2 dans le sang du patient en plus de l'antigène p24, permettant ainsi d'identifier les personnes présentant une infection au VIH établie ou précoce, non seulement pour la population des donneurs de sang, mais également pour certaines applications cliniques.

Le diagnostic précoce de l'infection via la détection d'antigène favorise la référence rapide des personnes infectées pour le début des interventions de traitement, de conseil et de prévention visant à réduire le risque de transmission et ceci en raison de leur capacité à détecter l'antigène p24. Mais dans certains cas exceptionnels, le test ELISA combiné donne des résultats faussement positifs (faux positif) à cause de l'administration du vaccin contre la grippe, présence d'anticorps anti-HLA-DR chez les femmes multigravidiqes, présence de facteurs rhumatoïdes, test RPR positif, hypergammaglobulinémie (par exemple, myélome multiple) et hépatite auto-immune. On peut aussi avoir des résultats du type faux négatifs lorsque le test est réalisé en période de séroconversion de 0jour-20jours ou en dehors de la période de détection par ELISA qui débute au 15^{ème} jour ou lorsque la concentration en P24 est trop faible pour être détectée pendant la fenêtre sérologique en question (**Singh, 2014**).

Dans notre cas, les tests sont concordants puisqu'ils donnent les mêmes résultats. Donc, nous pouvons dire que les résultats obtenus par les deux tests sont fiables. Cependant pour une confirmation définitive des résultats, des méthodes plus sophistiquées peuvent être utilisées comme le test western blot.

Le Test ELISA de 4^{ème} génération est assez amélioré et sensible pour donner des résultats fiables mais dans certains cas ils peuvent donner des résultats contradictoires. Dans ces

Résultats et Discussion

conditions il faut utiliser des méthodes qui se basent sur d'autres modes de détection comme le western blot.

3.3.4 Détection de l'infection au VIH par WESTEREN BLOT

Ce test est réalisé grâce à des bandelettes imprégnées d'antigènes du VIH-1 et VIH-2. Il est suffisamment sensible pour détecter de très faibles quantités d'anticorps spécifiques au VIH dans le sérum ou le plasma (voir figure 43).

Ce test a été effectué pour les patients P'3 et P'4 sur un deuxième prélèvement, puisqu'ils avaient déjà fait les tests ELISA (marque BIORAD, ADALTIS) et ARCHITECT au niveau de l'IPA, mais leurs résultats étaient douteux (voir tableau suivant).

Tableau 9: Récapitulatif des résultats des tests de détection de l'infection au VIH

Résultats Tests	P'3	P'4
T1: Test rapide	-	+
T2: ARCHITECT	(+/-)	(+/-)
T3: BIORAD	(-)	(-)
T4: ADALTIS	(+)	(+)

Résultats et Discussion

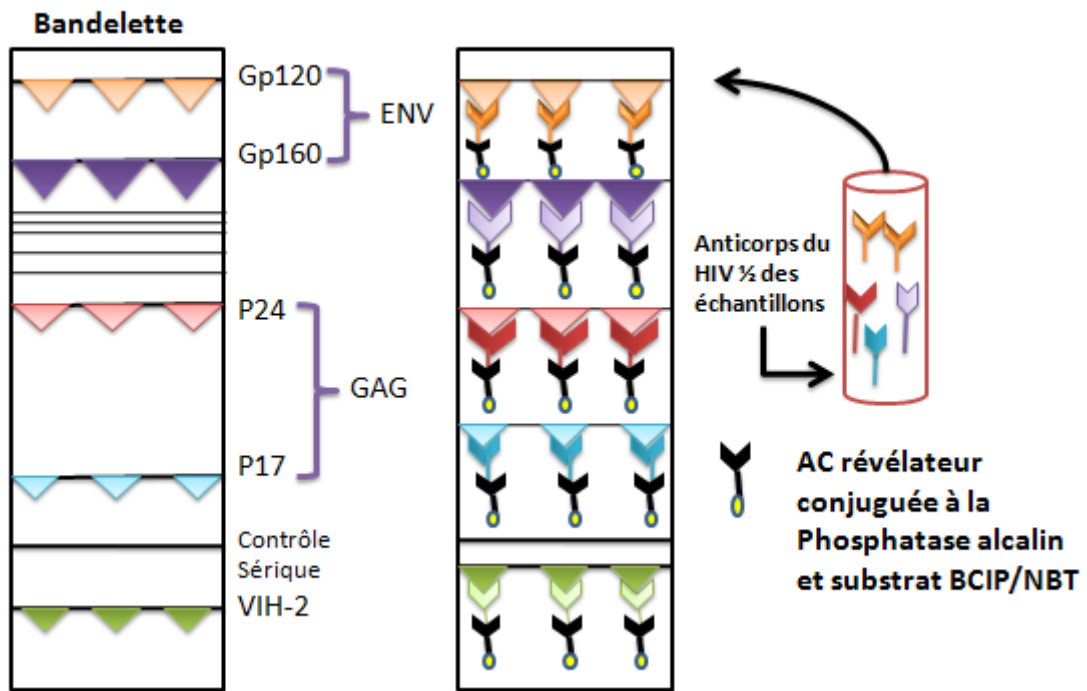


Figure 42: principe du test WESTERN BLOT

La figure 43 représente les résultats obtenus.

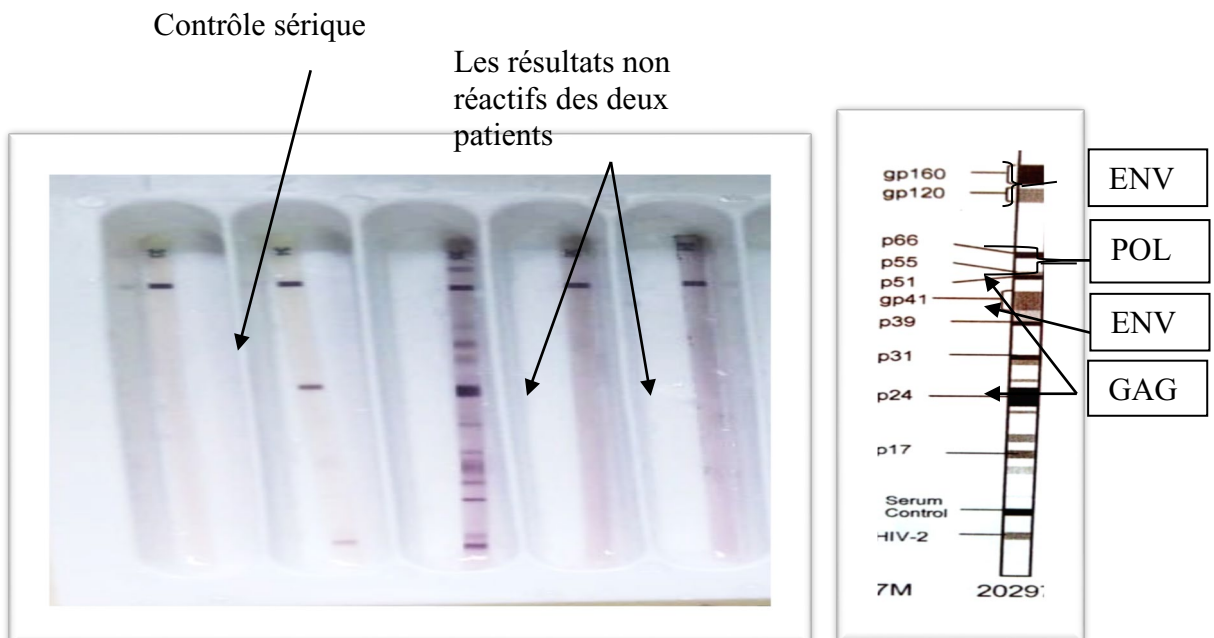


Figure 43: Résultat du test WESTERN BLOT

Interprétation des résultats

Les résultats qui peuvent être observés seront positifs ou négatifs.

Résultats négatifs:

Aucune bande virale spécifique n'est présente, Détection de la protéine P17 et aucune autre bande n'est observée (la bande P17 c'est une bande qui n'est pas vraiment spécifique pour le l'VIH)

Résultats positif au VIH-1: détection des 2 ENV (gp160/gp41 et gp120) etGAG (p17, p24, p55)ou POL(p31, p55, p66).

Résultats positif au VIH-1 et VIH-2: détection des 2 ENV (gp160/gp41 et gp120) etGAG (p17, p24, p55)ou POL (p31, p55, p66) et bande spécifique au VIH-2 visibleVIH-2 visible (à confirmer avec le western blot spécifique de VIH-2)

Les résultats peuvent aussi s'avérés ambigus on dit qu'ils sont Indéterminés, dans ce cas les bandes virales spécifique seront présentes mais leur profil ne remplissant pas les critères pour être positif.

La présence de la bande de contrôle sérique se réfère à l'ajout de sérum, conjugué et substrat.

La figure ci-dessus représente les 5 puits contenant les bandelettes qui représentent les résultats du test WESTERN BLOT. Les puits numérotés 1, 2, 3 représentent les trois contrôles, contrôle négatif réactif au VIH-1 et VIH-2 pour vérifier la contamination, le contrôle faible positif réactif au VIH-1 assure que ce test détecte la première protéine apparue p24, et le contrôle fort positif réactif au VIH-1 et VIH-2, confirme la détection de toutes les protéines. Les puits 4 et 5 représentent les échantillons.

- Les patients P'3 et P'4 présentent un résultat négatif parce qu'il n'y a eu, la révélation d'aucune bande protéique spécifique correspondant au matériel viral.

Récapitulatif des résultats des tests des patients P'3 et P'4

Parmi tous les patients, P'3 et P'4 ont subi une série de tests pour arriver à un diagnostic précis.

Le tableau 10 représente les résultats du test rapide, des tests ELISA et ARCHITECT des patients P'3 et P'4.

Résultats et Discussion

Tableau 10: Récapitulatif des résultats des tests de détection du HIV chez P'3 et P'4

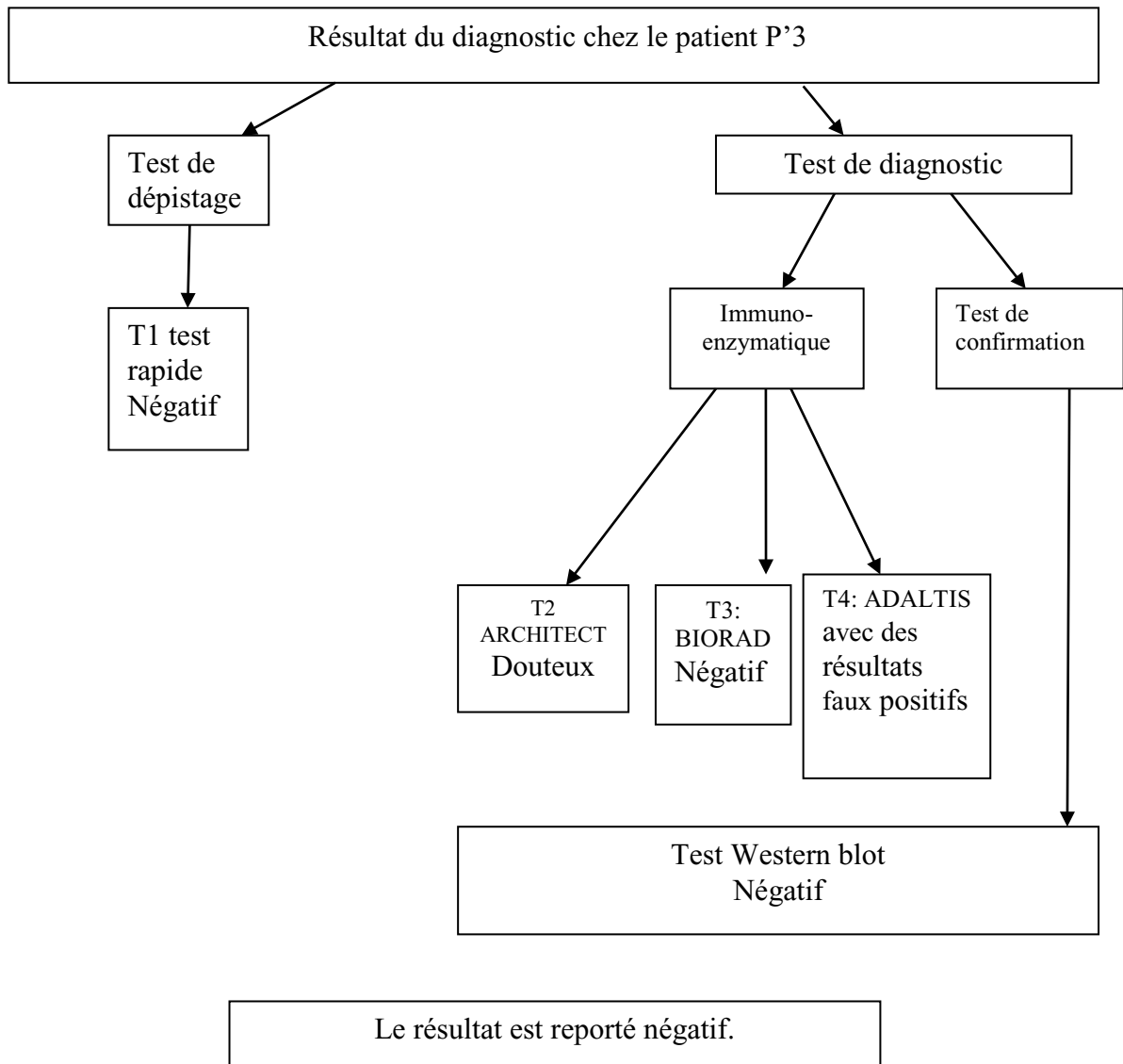
Résultats Tests	P'3	P'4
T1: Test rapide	-	+
T2: ARCHITECT	(+/-)	(+/-)
T3: BIORAD	(-)	(-)
T4: ADALTIS	(+)	(+)
T5: Western Blot	-	-

Seul le test Architect donne des résultats douteux. Pour les tests ELISA les résultats sont positifs ou négatifs, ces mêmes résultats peuvent être de faux positifs ou de faux négatifs.

Le tableau 9 présente les résultats des tests ELISA pour les deux patients, un test BIORAD résultats négatifs et le test ADALTIS positif mais les résultats du test ARCHITECT sont douteux puisque le ratio est dans la zone grise (0.9-0.99) (le patient P3:0.95S/CO et le patient P4:0.97S/CO), dans cette zone on ne peut pas assurer que le patient est séropositif ou séronégatif, donc les résultats des tests sont discordants. Pour cela, un diagnostic par WESTEREN BLOT, a été réalisé sur les patients P'3 et P'4 parce que c'est un test de confirmation spécifique qui comporte le profil général du VIH-1 et une protéine du VIH-2.

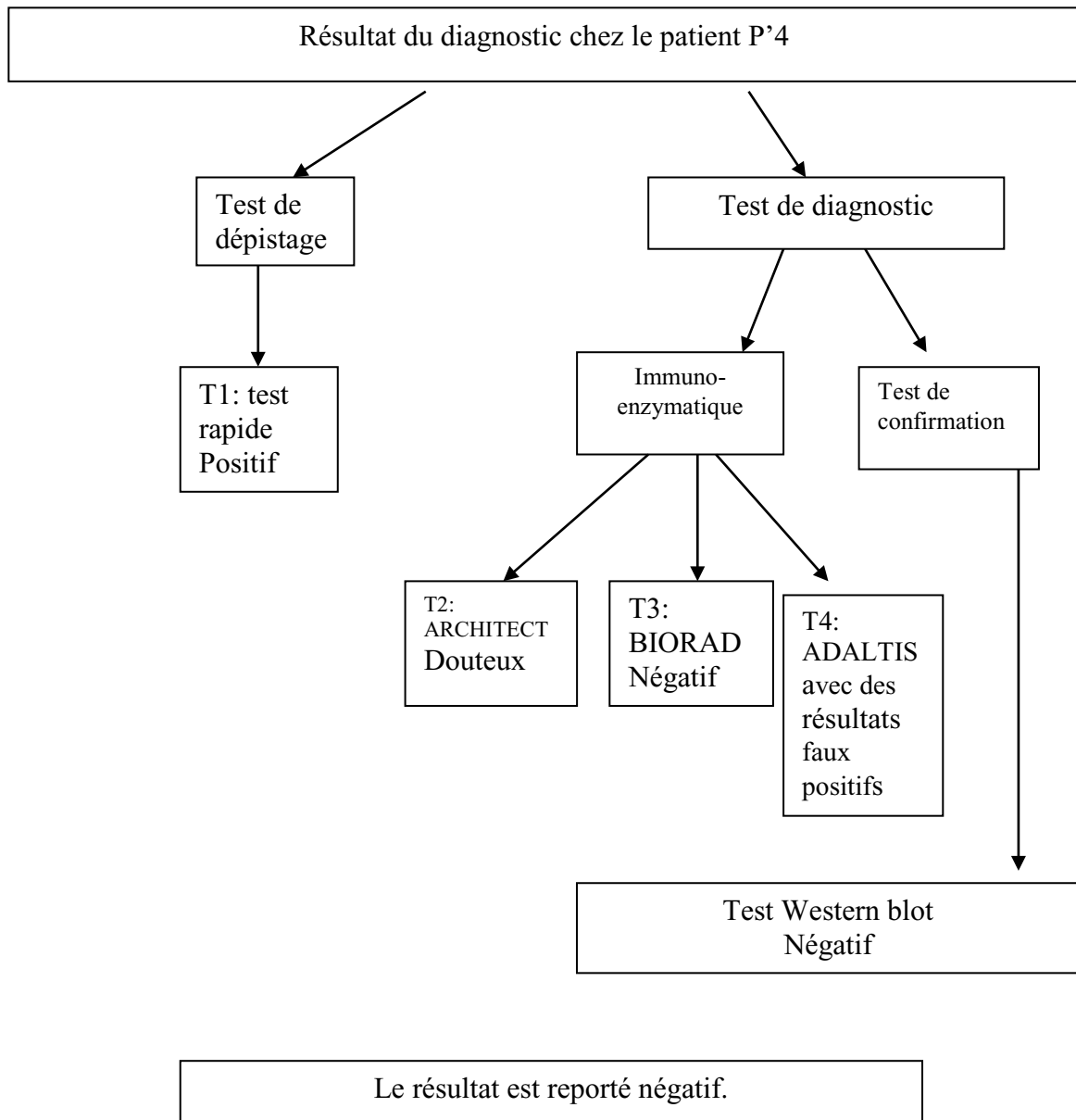
Les résultats de P'3 et P'4 sont les suivants:

Résultats et Discussion



T1 (testrapide) ce test est réalisé pour dépistage et non pas confirmation.

Résultats et Discussion



Le western blot ou immunoblot est un test de référence spécifique au VIH qui permet de connaître l'état de développement de la maladie. Cette technique ne donne pas de faux positifs et ceci grâce au profil général spécifique au VIH, mais donne des faux négatifs dans le cas où le prélèvement est opéré en période de séroconversion de 0 jour-20 jours ou en dehors de la période de détection par WESTERN BLOT qui débute au 28-29^{ème} jours grâce à l'apparition d'un taux d'anticorps suffisants, dans ce cas il faut rappeler le patient après 15 à 30 jours pour faire un deuxième prélèvement et confirmer si le patient est séronégatif. Dans certaines conditions on ne peut pas opérer le test western blot comme dans le cas des nourrissons de moins de 18 mois ou en cas d'un accident d'exposition au sang (AES), la technique la plus fiable dans ces conditions est la PCR.

3.3.5 Evaluation de la charge virale par la PCR en temps réel

Il s'agit d'une méthode d'amplification et de quantification du génome viral qui repose sur la RT-PCR en Temps Réel, pour évaluer la charge virale après des traitements préconisés, ou le diagnostic chez le nourrisson âgé de moins de 18 mois né de mère séropositive au VIH. Le principe général de la PCR repose sur l'une des propriétés fondamentales des ADN polymérases, celle de ne pouvoir synthétiser le brin d'ADN complémentaire qu'à partir d'une amorce. Le procédé nécessite la succession de nombreux cycles avec trois étapes (dénaturation, hybridation et élongation).

Une sonde oligonucléotidique complémentaire d'un fragment de la séquence à amplifier et quantifier est mise en présence de l'extrait d'ADN avec la Taq ADN polymérase et les amorces de PCR. Cette sonde a la particularité d'être marquée en 5' et en 3' par des composés fluorescents, différents à chaque extrémité : un reporter (R) en 5' et un quencher(Q) en 3'.

La fluorescence de R ne peut être émise lorsque la sonde est intacte, du fait de la proximité du second marqueur fluorescent Q. Par ailleurs la sonde est phosphorylée en 3', ce qui empêche son élongation lors de la PCR.

Au cours des cycles d'amplification, la sonde s'hybride à sa séquence complémentaire si le génome viral est présent dans le milieu réactionnel. Lors de l'élongation, l'activité 5'-3' exonucléase de la Taq ADN polymérase assure le clivage de la sonde, puis la séparation des fragments clivés de la matrice, libérant ainsi le marqueur R de l'influence du quencher. La fluorescence du marqueur R peut alors être émise (**Razina, 2008**).

Résultats et Discussion

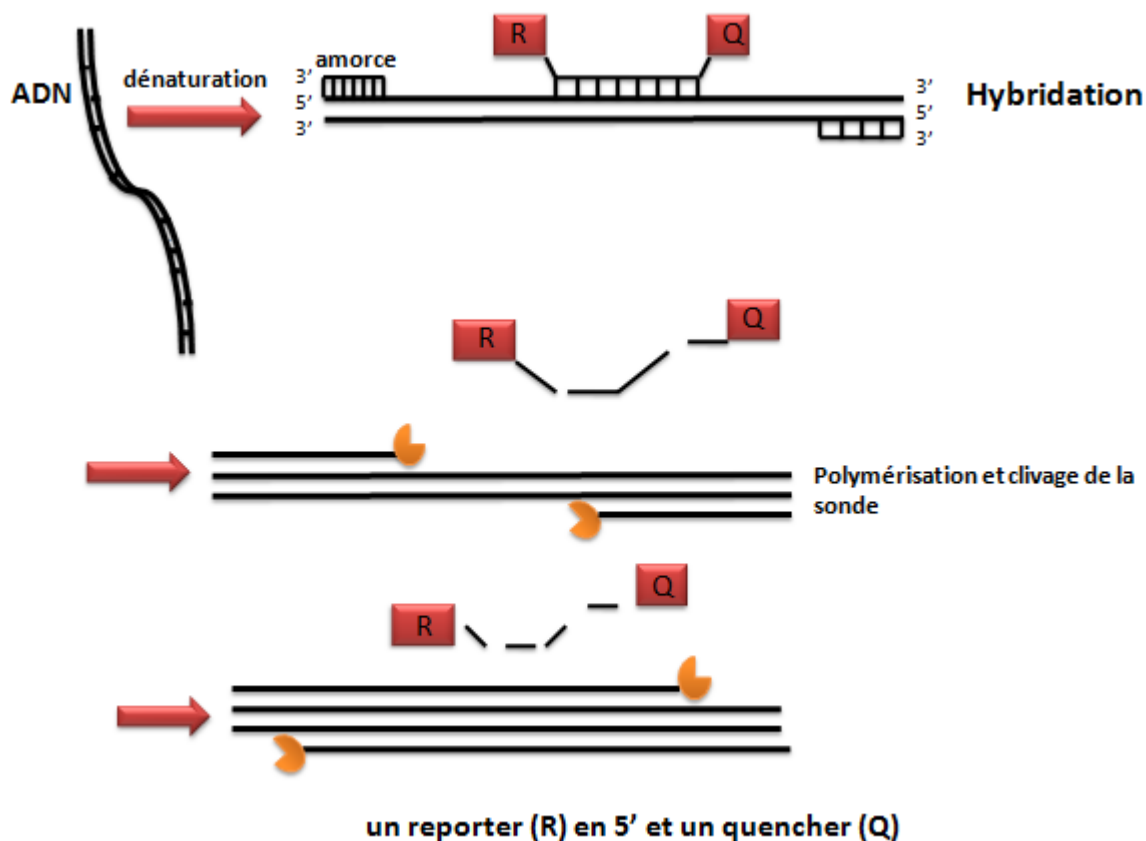


Figure 44: principe de la RT-PCR

Ce test a été réalisé chez le patient P'5 pour évaluer la charge virale avant et après la mise sous traitement médicamenteux par son médecin traitant. Le tableau 10 montre les résultats de la charge virale avant et après le traitement.

Tableau 10: Résultats du test de l'évaluation de la charge virale.

Patient et les contrôles	La charge virale avant le traitement	La charge virale après le traitement
Contrôle négatif	Non réactif	Non réactif
Contrôle fort positif	9.21E+2 CP/ml	9.21E+2 CP/ml
Patient P'5	14.58E+3 CP/ml.	18E+4 CP/ml

On remarque une augmentation de la charge virale qui indique une résistance viral au traitement donné, ce résultat est rencontré lorsque les patients ne suivent pas le plan de traitement qui leur est prescrit, souvent parce qu'ils n'ont pas un accès régulier à un traitement et à des soins de qualités. Les sujets porteurs d'un virus résistant seront progressivement en

Résultats et Discussion

échec thérapeutique et pourront le transmettre à autrui. Donc il faut faire un test de résistance qui est le séquençage afin de détecter le marqueur moléculaire responsable de la résistance observée (inhibiteur de protéase, intégrase ou transcriptase inverse).

Conclusion

Conclusion

Le SIDA est une maladie des plus mortelles pendant les dernières décennies. Sa dangerosité et sa persistance à cause de la difficulté à trouver un vaccin font que de grands efforts ont été versés dans la prévention et la détection de l'agent responsable c'est-à-dire le VIH. Les tests de détection peuvent être directs par recherche des protéines du VIH (p24) ou de son génome ou indirects par recherche des anticorps anti VIH développés par les patients.

Dans notre travail, le nombre total des échantillons est de 38. Parmi eux 33 échantillons ont été dépistés à l'EPH avec l'un d'entre eux pour confirmation et 5 à l'IPA. Ces derniers ont déjà tous étaient diagnostiqués séropositif et nécessitent une confirmation pour 4 d'entre eux, le cinquième doit subir une évaluation de la charge virale pour statuer sur le traitement suivi.

Les tests de dépistage, du VIH au niveau de l'EPH nous ont permis de détecter l'infection du patient P33. Cependant ce dernier résultat doit être confirmé par une technique plus sensible au niveau de l'IPA. Ceci correspond à la procédure établie dans l'algorithme de diagnostic. Les donneurs de sang P1- P32 ont tous présenté des résultats négatifs.

Les tests de diagnostic du VIH adopté à l'IPA ont permis de conclure à une infection par le VIH du patient P'2. Les patients P'1, P'3, P'4 ont présenté des résultats négatifs. Concernant le patient P'5, il a été observé par la PCR en temps réel que le taux des virus n'a pas subi de chute par le traitement testé. Ce type de résultats peut être dû à plusieurs raisons dont la principale est le développement de la résistance causée par les déterminants génétiques de l'inhibiteur de protéase, l'intégrase ou la transcriptase inverse. En conclusion, nous pouvons dire que le protocole du diagnostic du VIH adopté en Algérie est complet et ne permet aucun doute sur les résultats obtenus. En effet ce protocole commence par des tests rapides directs ou indirects, passe par les méthodes ELISA qui sont de différentes firmes et différentes sensibilités, puis le western blot et enfin la PCR en temps réel. Ce dernier test est surtout adopté lorsque le patient est sous traitement. En effet l'évaluation de la charge virale est un critère primordial dans l'appréciation de l'efficacité d'un traitement. Cette dernière technique est aussi très efficace dans le cas du dépistage du VIH chez les nouveaux nés de moins de 18 mois puisque toute analyse par la présence des anticorps peut donner de faux résultats par absence d'anticorps à cause de l'immaturation de leur système immunitaire ou par leur présence étant issus de la mère.

Conclusion

En Algérie, L'algorithme établi pour le diagnostic du VIH, commence par le test rapide qui a l'avantage de donner les résultats en 30 min, ce test est utilisé pour les analyses pré-opératoires, en cas de doute d'infection ou pour les femmes enceintes et enfin pour les analyses prénuptiales. Cependant ce test comprend plus d'inconvénients que d'avantages, puisqu'il dépend de la fenêtre sérologique (du jour de l'infection au jour de la détection) qui est assez longue d'où l'expression de résultats négatifs qui peuvent être de faux négatifs. Pour cela, ce test est non fiable alors de préférence il faut le refaire trois mois après le 1^{er} test ou l'associer à un autre test de quatrième génération pour faire une détection plus sûre et bien protéger les vies des gens.

Pour le test ELISA utilisé, au niveau de l'EPH, pour dépister la maladie qui est censé sauver des vies, il est moins sensible que le test d'Architect. Ce dernier peut être recommandé pour ce type d'analyses.

Sachant que le VIH-1 est le plus dominant en Algérie mais il peut y avoir contamination par le 2^{ème} type VIH-2 grâce aux porteurs étrangers à cause de la transmission sexuelle ou les UDI. Il est à conseiller de se doter de la PCR VIH-2 au niveau de l'IPA.

Comme décrit par l'algorithme adopté dans les institutions médicales algériennes, les techniques utilisées dans la détection des infections par le VIH sont très nombreuses et vont des plus simples au plus sophistiquées et plus sûres. Cependant une prévention avisée reste de rigueur. En effet, comme toute maladie dangereuse, il faut prévenir la survenue de l'infection pour cela il faut éviter la transmission sanguine par une désinfection des aiguilles de tatouage, éviter aussi l'utilisation collective des lames de rasoir par exemple et pour la transmission sexuelle il faut éviter les relations sexuelles hors mariage sinon recommandé l'utilisation de préservatif. Dans le cas de la transmission verticale mère-enfant il faut interdire absolument l'allaitement d'un enfant par une mère séropositive même si le plus grand risque d'infection réside au moment de l'accouchement.

Référence Bibliographique

Référence bibliographique

Albrecht J, 2016, Mise en place de dépistage du virus de l'immunodéficience humaine de la formation aux premières dispensations, thèse de doctorat, université de lorraine, 165p.

Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière, 2013, guide national du diagnostic biologique de l'infection a VIH / SIDA, 34p.

Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière, 2015, guide national du diagnostic biologique de l'infection a VIH / SIDA, 45p.

Carayon K, 2008, Etude des paramètres structuraux et cinétiques caractérisant les interactions rétrovirales / ADN et l'étape de 3'-processing, thèse de doctorat, école normale supérieure de Cachan, 243p.

Singh K, 2014, causes of false positive HIV elisa diagnostic test results, Clinician Consultation Center, 2014.

Dulude D, 2006, the structure of the frameshift stimulatory signal in HIV-1 RNA: a potential target for the treatment of patients infected with HIV, *Med Sci (Paris)* 22(11) 969-972.

Handerson G, 2018, Ethique des essais d'information de traitement dans la recherche sur la guérison du HIV résoudre le problème de l'évaluation risque bénéfice, *J Med Ethique*, 44(4), 270-276.

Hennous M, 2015, journée mondial de lutte contre le SIDA.

Hennous M, 2018, rapport sur situation de SIDA dans le monde.

Kernbaum S, 1992, Le praticien face au SIDA, ed: rue Casimir Delavigne, paris, 269p.

Klarkowski D, 2014, causes of false-positive HIV rapid diagnostic test results, *Expert Rev Anti infect Ther*, 12(1) ,49-62.

Leghmari K, 2008, la protéine Tat du virus d'immunodéficience humaine (VIH) induit la production de L'IL -10 et du TNF-alpha dans le monocyte / macrophage humain: étude des mécanismes d'activation de la voie NF-KappaB, université de Toulouse, 311p.

Matysiak J, 2016, Intégration du VIH-1 : Contrôle et régulation de l'interaction fonctionnelle entre l'intégrase et la chromatine, thèse de doctorat, l'université de bordeaux, 225p.

Référence Bibliographique

Ohlman T, 2014 traduction initiation of ARNm of HIV-1, traduction (austin), 2(2)

Razina, ALI, ADA, ISSIA, 2008, Utilisation de la PCR en temps réel pour le diagnostic précoce de la transmission verticale du VIH, thèse de doctorat, Université de Bamako, 119p.

Santerre M, 2010, identification des protéines capables des s'associer avec la région de l'ARN du virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) contenant le site d'épissage A7 et découverte d'un nouveau régulateur général de l'épissage alternatif de l'ARN du VIH-1, la protéine hnRNP K, thèse de doctorat, université de nancy 401p.

Sagna T, 2012, caractérisation moléculaire du VIH et du papillomavirus humain chez les femmes en âge de procréer infectées et diagnostic précoce par la PCR du VIH chez leurs enfants au centre médical saint camille et au CERBA-Ouagadougou; thèse de doctorat; université de Ouagadougou, 160p.

Sontie B, 2010, du driedblood spot ou DBS dans le diagnostic précoce de l'infection par le VIH-1 chez les enfants de moins de 18 mois nés de mère infectée: comparaison des résultats de la PCR-ARN plasmatique et de la PCR-ADN sur DBS, thèse de doctorat, université de ouagadougou, Burkina Faso 123p.

Vitte A, 2006; régulation de l'activité de la protéine Rev du HIV-1 par des modifications post-traductionnelles et inhibition de sa fonction par des peptides actifs à partir du milieu extracellulaire, thèse de doctorat; école normale supérieure de Lyon; 252p.

Wesley I, krausslich H, 2012, Assembly, budding and maturation of VIH-1, journal Cold Spring Harb Perspect Medicine, 2(7).