



**UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES – FES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE**



PROJET DE FIN D'ETUDES

**Licence en Sciences & Techniques :
Biologie & Santé**

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE L'INFECTION A VIH

- 2013-2014 -

Présenté par : LAAMIMI Amjad

Encadré par :

Dr. MAOULOUA Mohamed :

Laboratoire Med V
Meknès.

Pr. GUISSI Sanae :

FST Fès.

Soutenu le : 13 Juin 2014

Devant le jury composé de :

➤ Pr. GUISSI Sanae :

Président.

➤ Dr. MAOULOUA Mohamed :

Encadrant.

➤ Pr. Tahri Ali :

Examineur.

Année Universitaire : 2013-2014.

Dédicaces

Je dédie ce travail :

À mes parents :

Honorables, aimables : vous représentez pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi afin de mener à bien mes études. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez, pour tous les sacrifices que vous n'avez cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

À mon oncle Abdelouahab El filali et sa petite famille :

Votre soutien moral, votre suivi et votre gentillesse m'ont permis de réussir, car sans vos conseils, ce travail n'aurait jamais vu le jour.

Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

À ma petite sœur Bassma :

A ma chère sœur qui est toujours présente avec son soutien moral, je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité. Je t'exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour.

À mes ami(e)s :

Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des frères, sœurs et des amis sur qui je peux compter.

Remerciements

J'exprime ma gratitude tout d'abord, au **DR MAOULOUA MOHAMED**, chef du laboratoire de l'hôpital Med V Meknès, de m'avoir intégré au sein du laboratoire et de m'avoir accordé toute sa confiance. Je le remercie pour le temps qu'il m'a consacré tout au long de cette période, sans oublier sa participation au cheminement de ce rapport.

Je remercie également **Dr O.ATMANI**, responsable de l'unité de sérologie, pour l'effort fourni, les conseils prodigués, sa patience et sa persévérance dans le suivi.

J'adresse mes plus vifs remerciement à mon encadrante, **Mme LE PROFESSEUR GUISSI SANAE** d'avoir accepté d'encadrer ce travail, pour sa disponibilité, son encouragement et son soutien. C'est avec un réel plaisir que j'ai effectué ce stage sous sa direction.

Je remercie **Mr LE PROFESSEUR TAHRI Ali** qui a accepté de participer à la soutenance de ce modeste projet de fin d'étude.

Je tiens à remercier aussi l'ensemble du personnel du laboratoire de l'hôpital Med V, **DR M. LAHSOUN**, Madame **O. SENTISSI**, et tous les techniciens du laboratoire pour l'expérience enrichissante et pleine d'intérêt qu'elles m'ont fait vivre durant ces deux mois au sein du laboratoire.

Mes remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui auront contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce rapport ainsi qu'à la réalisation de ce travail.

Objectif

Ce stage est désormais une étape essentielle de mon parcours de formation. Il me permet de me rapprocher du milieu professionnel, notamment celui du volet biomédical. Pendant la période de stage qui a duré deux mois, l'objectif était surtout axé sur la familiarisation avec les techniques de dépistage du VIH ainsi que les techniques de confirmation par western blot.

Présentation du laboratoire :	1
Introduction :	2
I. Généralités :	3
1) Historique :	4
2) Description du VIH :	4
3) Structure de VIH :	4
4) Variabilité virale du VIH :	6

5) Le cycle de réplication de VIH :.....	7
6) Histoire naturelle de la maladie :	8
7) Epidémiologie du VIH :.....	10
❖ Dans le monde :.....	10
❖ Au Maroc :.....	11
a) Distribution de l'infection à VIH selon l'âge.....	11
b) Répartition de l'infection à VIH selon le sexe.....	12
c) Distribution géographique du VIH au Maroc.....	12
8) Transmission du VIH et prévention :.....	13
9) Traitements :.....	14
10) Prise en charge de l'infection à VIH au Maroc :.....	16
II. Matériel et méthodes :.....	18
1) Matériel :.....	19
2) Méthodes :.....	20
a) ELISA :.....	20
• Mode opératoire :.....	20
b) TDR :.....	21
➤ Principe biologique de la méthode :.....	21
➤ Mode opératoire :.....	22
➤ Résultats de TDR :.....	23
➤ Comparaison TDR et test ELISA :.....	24
c) Western blot :.....	25
1. Principe :.....	25

2. Protocol expérimental	26
3. Résultats de WB	27
4. Interprétation des résultats	28
Résultats et discussion	29
1- Le nombre de test ELISA au LBM durant l'année 2012 Validation de test	30
2- Le nombre de TDR au LBM durant les années 2013 et 2014	30
3- La confirmation par WERTERN BLOTT	32
III. Conclusion	35
Annexes	36
Référence	41

Liste des abréviations :

- WB : western blot
- VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
- SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise
- Ac : Anticorps
- Ag : Antigène
- ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
- ARV : antirétroviraux
- TDR : Test de Dépistage rapide
- PVVIH : personne vivant avec le VIH

- AES : les Accidents d'Exposition au Sang
- OMS : Organisation Mondiale de la Santé
- MS : ministère de la santé
- pTME : prophylaxie transmission mère enfant
- LBM : laboratoire de biologie médical

Liste des figures:

- *Figure 1 : structure de VIH*
- *Figure 2 : le génome de VIH*
- *Figure 3 : variabilité du VIH*
- *Figure 4 : sous types de VIH au Maroc*
- *Figure 5 : le cycle de réplication du VIH*
- *Figure 6 : Evolution de la CV et des CD4 durant les différentes phases de l'infection à VIH/sida*
- *Figure 7 : Estimation du nombre d'adultes et d'enfants vivant avec le VIH en 2012 (rapport ONUSIDA, novembre 2013)*
- *Figure 8: Distribution des cas VIH-Sida selon l'âge au Maroc*
- *Figure 9 : Distribution des cas VIH-Sida selon le sexe au Maroc*
- *Figure 10 : Distribution géographique de VIH au Maroc*
- *Figure 11 : Les voies d'action thérapeutiques des antirétroviraux.*
- *Figure 12 : La chronologie de la positivité des tests*
- *Figure 13 : Tube à essai avec du sang centrifugé.*

- *Figure 14 : centrifugeuse Labafuge 400*
- *Figure 15 : Schéma explicatif de la méthode ELISA.*
- *Figure 16: la bandelette de TDR*
- *Figure 17 : Etapes de test rapide*
- *Figure 18: les différents résultats de TDR.*
- *Figure 19 : l'ensemble des réactifs utilisés dans le WB.*
- *Figure 20 : l'agitateur 3D des racks*
- *Figure 21 : les différents résultats de WB.*
- *Figure 22 : le nombre de TDR VIH par mois et par résultat pour l'année 2013 et 2014*
- *Figure 23 : le pourcentage des cas de TDR négatif années 2012 et 2013*
- *Figure 24: Le nombre de tests WB en fonction des renseignements cliniques*

Liste des tableaux

- *Tableau 1 : Le nombre de test ELISA « VIH » pour l'année 2012*
- *Tableau 2 : Le nombre de TDR VIH pour l'année 2013 et 2014*
- *Tableau 3 : Le nombre de TDR et ELISA positif depuis 2012*
- *Tableau 4 : Le nombre de tests WB en fonction des renseignements cliniques*
- *Tableau 6: Réactifs nécessaires en fonction de nombre de bandelettes.*
- *Tableau 7 : critères d'interprétation du WB en fonction des organisations*
- *Tableau 8: corrélation entre les différentes bandes (antigènes) et leurs poids moléculaires*

Présentation du laboratoire de L'Hôpital Mohamed V à Meknès

L'Hôpital Mohamed V de Meknès a été créé en 1953 et inauguré le mardi 17 juillet 1956, par sa majesté Mohamed V qui lui a attribué son nom.

❖ Le laboratoire **Mohamed V** comprend :

a) Une salle de prélèvements :

Où sont réalisés les prélèvements sanguins, urinaires,...

b) Unité de sérologie :

Dans cette unité sont réalisées plusieurs analyses (TSH, TPHA, VDRL, VIH,....)

c) Unité du Biochimie :

Où sont réalisés des dosages et des analyses demandées par des médecins .La plupart de ces analyses sont effectuées par des automates (GLY , AU ,ASAT ,ALAT ,....)

d) Unité bactériologie :

Où est réalisée l'identification des agents responsables de plusieurs infections (bactérie, parasite, champignons,..)

Le but de ces analyses est souvent l'identification du germe pathogène pour définir le meilleur traitement et l'antibiotique le plus efficace.

e) Unité d'hématologie :

Où sont effectuées des analyses comme : (Groupage, NFS, VS, TP, TCK...)

Introduction :

Dans les années quatre-vingt, l'apparition d'une maladie nouvelle créa un véritable bouleversement dans le domaine de la virologie.

Nul ne savait encore que, trente ans après, l'épidémie d'infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) constituerait un problème de santé publique majeur dans le monde, avec 35 millions [32,2 millions -38,8 millions] de personnes infectées [1].

Au Maroc, près de 30 000 personnes sont atteintes et de nouvelles contaminations se produisent chaque jour malgré les différentes campagnes de prévention [2].

En l'absence de traitement efficace, ce syndrome chronique se caractérise par la présence d'un rétrovirus qui a pour cible les lymphocytes T CD4+. Son appartenance au genre Lentivirus lui confère un caractère latent. Il affaiblit progressivement le système immunitaire de l'hôte jusqu'au développement du syndrome d'immunodéficience acquise ou SIDA.

Les progrès accomplis au niveau du diagnostic virologique sont en grande partie dus à une meilleure connaissance de divers constituants du rétrovirus. L'accès aux séquences complètes de la plupart des gènes viraux, a facilité en particulier, la synthèse des protéines recombinantes, simplifiant ainsi la synthèse des Ac monoclonaux spécifiques et la mise au point des trousse de diagnostic sérologique.

La biologie moléculaire est devenue un outil très utile pour le diagnostic précoce et le suivi des infections virales, parasitaires, et bactériennes. Les chercheurs collaborent pour le développement des traitements antirétroviraux efficaces permettant de diminuer la mortalité.

L'objectif de cette étude consiste d'une part à pratiquer et maîtriser les tests de dépistage du VIH (le test de dépistage rapide et le test ELISA), ainsi que les tests de confirmation (le Western blot et l'immun blot) et d'autre part de faire une étude statistique sur le diagnostic de l'infection à VIH réalisé au laboratoire.

GENERALITES

1) L'historique du virus du SIDA [3]:

C'est en 1981 que M.Gottlieb à Los Angeles, a été amené à observer une pneumonie à *Pneumocystis carinii* chez un sujet masculin jeune sans antécédents médicaux notables. La pneumocystose était alors une maladie exceptionnelle rencontrée chez les grands immunodéprimés iatrogéniques. Ce patient présentait un effondrement d'une population lymphocytaire jouant un rôle majeur dans l'orchestration des défenses immunitaires, il s'agit des lymphocytes T porteurs des récepteurs CD4 (T CD4). En quelques semaines, d'autres cas de pneumocystose, parfois associés à un sarcome de Kaposi ont été répertoriés chez des hommes jeunes qui sont tous homosexuels. Cette pathologie nouvelle, le « gay syndrome » a fait l'objet de publications et immédiatement, des mises en alerte sont apparues. Le terme SIDA va alors être retenu pour cette infection.

Dès 1982, les chercheurs scientifiques découvrirent que la transmission du VIH peut se faire également par le sang, surtout lors des transfusions sanguines. Cette maladie n'atteint donc pas que les homosexuels et les toxicomanes, mais aussi les hémophiles.

En 1986, un virus proche mais distinct du HIV-1, fut isolé par L. Montagnier et son équipe chez des sujets atteints de sida et ayant séjourné en Guinée-Bissau. Il fut nommé HIV-2 et semble moins agressif pour l'organisme que le HIV-1.

Depuis, les progrès de la recherche ont permis de mettre au point les premiers traitements, en 1987, l'AZT ou Retrovir fut le premier médicament mis sur le marché.

De nos jours, les multi thérapies ont permis d'augmenter la survie de près de 85% des patients avec une virémie contrôlée.

Cependant, presque trente ans après la révélation de la maladie, les scientifiques sont toujours à la recherche d'un vaccin ou d'un traitement curatif.

2) Description du VIH [4]:

Le VIH appartient à la famille des retroviridae, vaste famille de virus à ARN équipés d'une enzyme structurale appelée transcriptase inverse ou reverse transcriptase (RT). Il est classé dans le genre des lentivirus qui a pour caractéristique d'entraîner des infections virales lentes toujours mortelles.

3) Structure de VIH [5]:

1. **L'enveloppe protectrice externe (enveloppe virale):** elle est constituée de 2 couches lipidiques et de 2 types de glycoprotéines les GP 120 et les GP 41 :
 - Les Gp 120 correspondent aux spicules d'attachement, occupent une position périphérique et se fixent spécifiquement sur les protéines CD4 des Lymphocytes et des macrophages.
 - Gp41 traverse la bicouche lipidique en induisant la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane phospholipidique de la cellule.
2. **La capsid :** elle protège le matériel génétique. Elle est faite de protéines virales libérées après destruction de virus :
 - La protéine p24 est la protéine majeure de la capsid.
 - La protéine p17 est la protéine de la matrice.

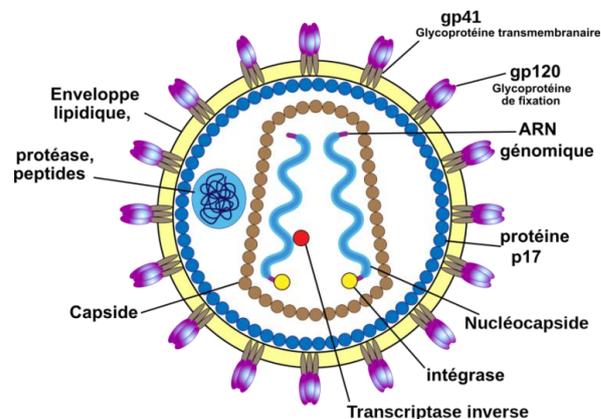


Figure 1 : structure de VIH

3. **Le génome :** il est constitué de 2 copies identiques d'ARN simple brin d'environ 9200 nucléotides, de polarité positive. Trois gènes structuraux fondamentaux sont dénombrés.
 - **le gène gag :** qui code les protéines de la nucléocapsid (p40, p25 et p18).
 - **le gène pol :** qui détermine la synthèse des enzymes nécessaires à la réplication virale, dont la transcriptase inverse
 - **le gène env :** qui permet la synthèse des protéines de surface de la particule virale.

Le génome du VIH présente à chacune de ses extrémités une même séquence de taille variable : LTR pour Long Terminal Repeat. Les LTR, sont des régions non codantes, contenant les éléments promoteurs qui contrôlent l'intensité de l'expression des gènes viraux.



Figure 2 : le génome de VIH

4) Variabilité virale du VIH [10]:

Il n'existe pas un seul, mais une multitude de virus VIH très proches les uns des autres. La grande variabilité génétique de ces virus est due au processus même de leur réplication. Elle est le reflet de l'infidélité de la transcriptase inverse, enzyme peu fiable commettant de nombreuses erreurs lors de la synthèse d'ADN bicaténaire et provoque les mutations.

Cependant, tous les virus ne se multiplient pas à la même vitesse ni avec la même intensité dans une cellule hôte, et tous n'utilisent pas les mêmes cibles pour se multiplier. Il y a deux types principaux de VIH appelés VIH-1 et VIH-2. Alors que le VIH-1 a une distribution mondiale, VIH-2 est surtout présent en Afrique de l'Ouest.

Pour le VIH-1 trois groupes distincts ont été dénombrés: les groupes M, N et O.

Le groupe M (groupe majoritaire, >98%), groupe O (outlying, <1%), et groupe N (nouveau, <1%).

Le groupe M est responsable de la majorité des infections VIH-1 dans le monde et peut être subdivisé ensuite en sous-groupes reconnu phylogénétiquement: sous-types (clades).

Sous type A: 23%; sous type B: 8%; sous type C: 56%; sous type D: 5%; sous type E: 5%; et sous types F-K: 3%.

Il y a aussi des recombinants, qui contiennent un mélange de ces sous types: CRF Circulating Recombinant Form. Les recombinants les plus communs sont des mélanges de sous types AE et AG; les moins fréquents sont les mélanges de sous types AGHK, AFGHJK, AB, et BC.

Cette variabilité du VIH pose problème dans la recherche de vaccin ainsi que dans l'apparition des résistances aux traitements.

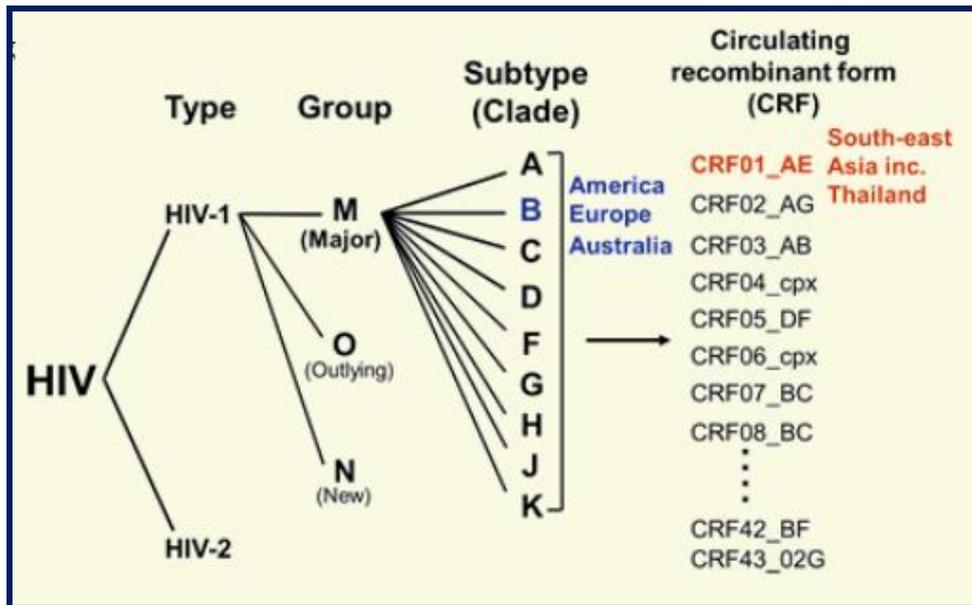


Figure 3 : variabilité du VIH

Au Maroc le sous type B reste prédominant avec plus de 55%, mais surtout avec l’immigration, on assiste à l’apparition de nouveaux sous types subsahariens non B. « Voir annexe 1 »

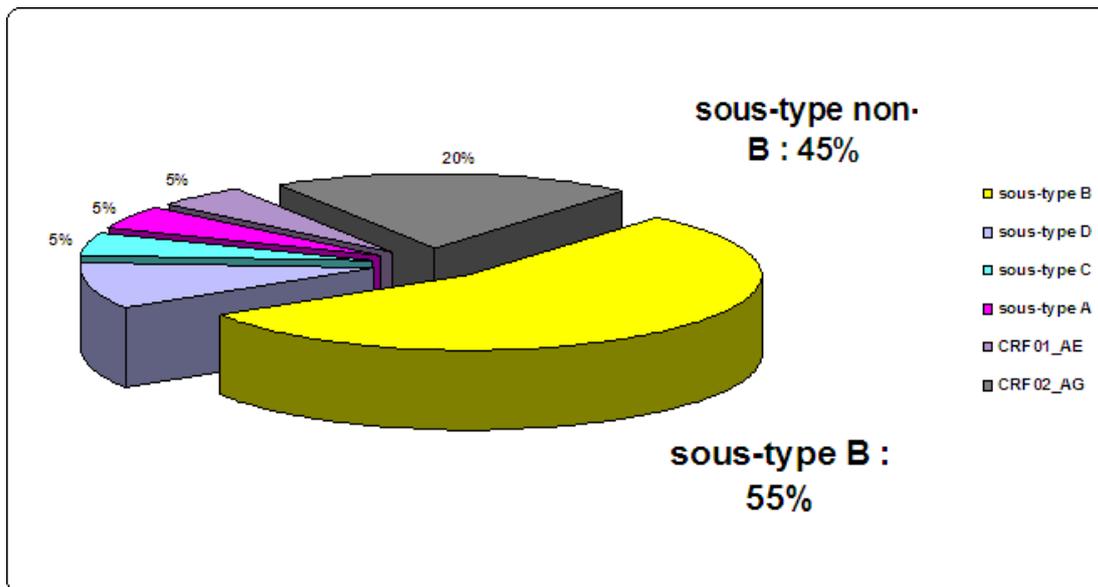


Figure 4 : sous type de VIH au Maroc

5) Cycle de réplication du VIH [6]:

Le VIH infecte les cellules du système immunitaire et plus spécifiquement les Lymphocytes T CD4.

Le processus se déroule de la façon suivante :

L’attachement : se fait par la liaison de Gp 120 du virus au récepteur CD4 de la cellule.

La liaison au co-récepteur : l'interaction entre Gp120 et le récepteur CD4 entraîne des modifications de la forme des protéines et permet à la Gp120 de se fixer sur un co-récepteur (le CCR5), cette fixation démasque la protéine Gp41 qui permet la fusion de l'enveloppe virale avec celle de la cellule.

L'injection de la capsid, la décapsulation et la libération de l'ARN.

La transcriptase inverse convertit le brin d'ARN en double brins d'ADN. C'est l'étape cruciale du cycle du VIH.

L'ADN viral nouvellement synthétisé et transporté vers le noyau de la cellule et intégré dans le génome de la cellule hôte grâce à une enzyme **L'intégrase** qui reconnaît spécifiquement les deux LTR aux extrémités de l'ADN viral.

A un moment donné, la transcription de l'ADN en ARN commence. Les cellules CD4 vont produire un ARN d'origine virale.

L'ARN formé va quitter le noyau et dans le cytoplasme les ribosomes de CD4 lisent les informations contenues dans ces brins d'ARN et synthétisent de nouvelles protéines virales.

Les protéines virales produites sont sous forme de précurseurs, elles doivent subir une maturation post-traductionnelle pour devenir fonctionnelles. Ceci est la fonction de **la protéase**.

Le processus de maturation va durer jusqu'à l'assemblage définitif de la capsid.

Le nouveau virus bourgeonne et finit par se détacher de la cellule.

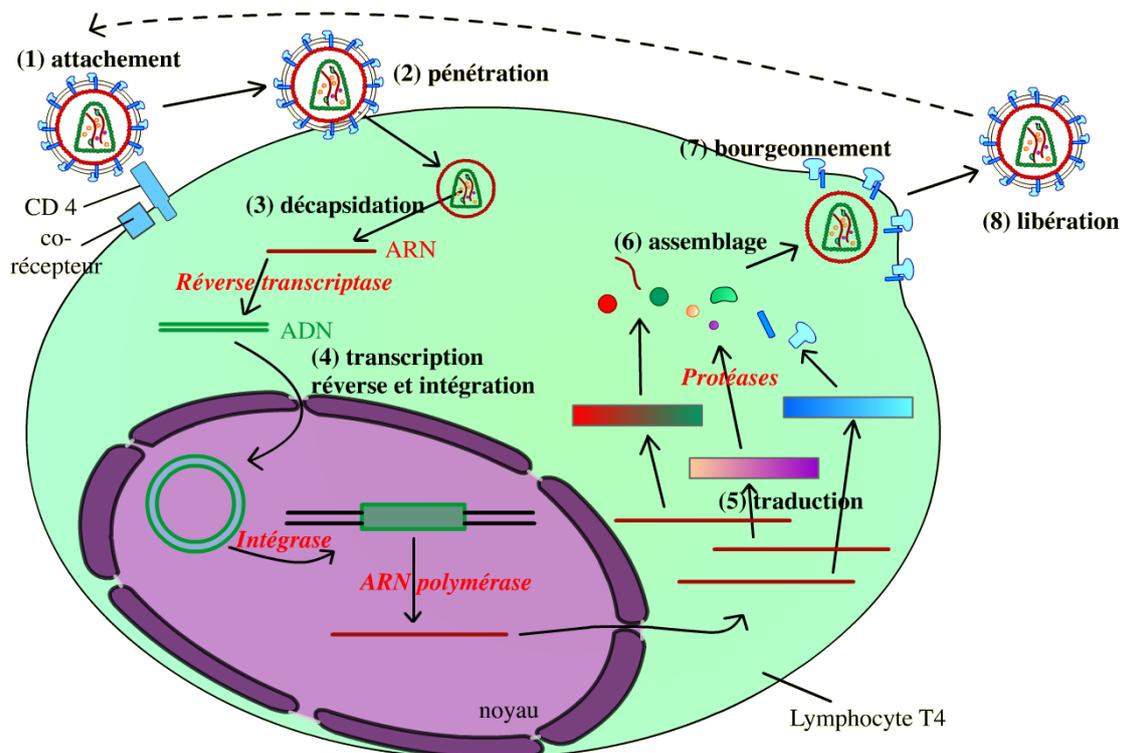


Figure 5 : le cycle de réplication du VIH

6) Histoire naturelle de la maladie [7] :

Le sida est le stade dont l'évolution s'effectue en plusieurs phases :

a. La contamination :

Elle intervient de 0 à 48 heures maximum après un contact sexuel ou sanguin avec le virus.

b. La dissémination:

Elle intervient 48 heures après la contamination. Le virus se dissémine et s'installe dans les ganglions. Il est en très faible concentration dans le sang. La prise d'un traitement ne permet pas d'éliminer le virus mais diminue nettement sa multiplication.

c. La primo-infection :

La primo-infection intervient entre 10 et 40 jours après la contamination. Le virus se multiplie de façon intense et devient apparent dans le sang. Des signes pseudo-grippaux sont souvent observés:(fièvre, courbatures, mal de gorge, gonflement des ganglions, éruptions cutanées...).

d. La phase asymptomatique :

Elle intervient à partir du 30^{ème} jour après la contamination. Des anticorps anti-VIH sont détectables dans le sang. L'infection peut rester de longues années silencieuse ou latente. En effet, dans les 10 années suivant la découverte de leur séropositivité, 60% des sujets infectés développeront un véritable SIDA et 20% des sujets contaminés ne présenteront aucun signe de la phase SIDA. Certains sujets souffriront de troubles tels que la grippe ou d'une affection comme la mononucléose, alors que d'autres ne connaîtront aucun trouble. Un traitement par multi-thérapie est possible dès confirmation sérologique du diagnostic.

e. Le stade SIDA :

Il apparaît 10 ans voire plus, après la contamination. Les défenses immunitaires s'effondrent et des maladies graves apparaissent telles des cancers, et toutes sortes d'infections opportunistes car les microbes profitent de l'amoindrissement des défenses immunitaires pour envahir l'organisme (pneumonies, tuberculose,..). Des manifestations neurologiques

apparaissent également quand le VIH pénètre dans le cerveau (pertes de mémoire, confusion de langage, diminution de l'acuité visuelle, troubles psychiques).

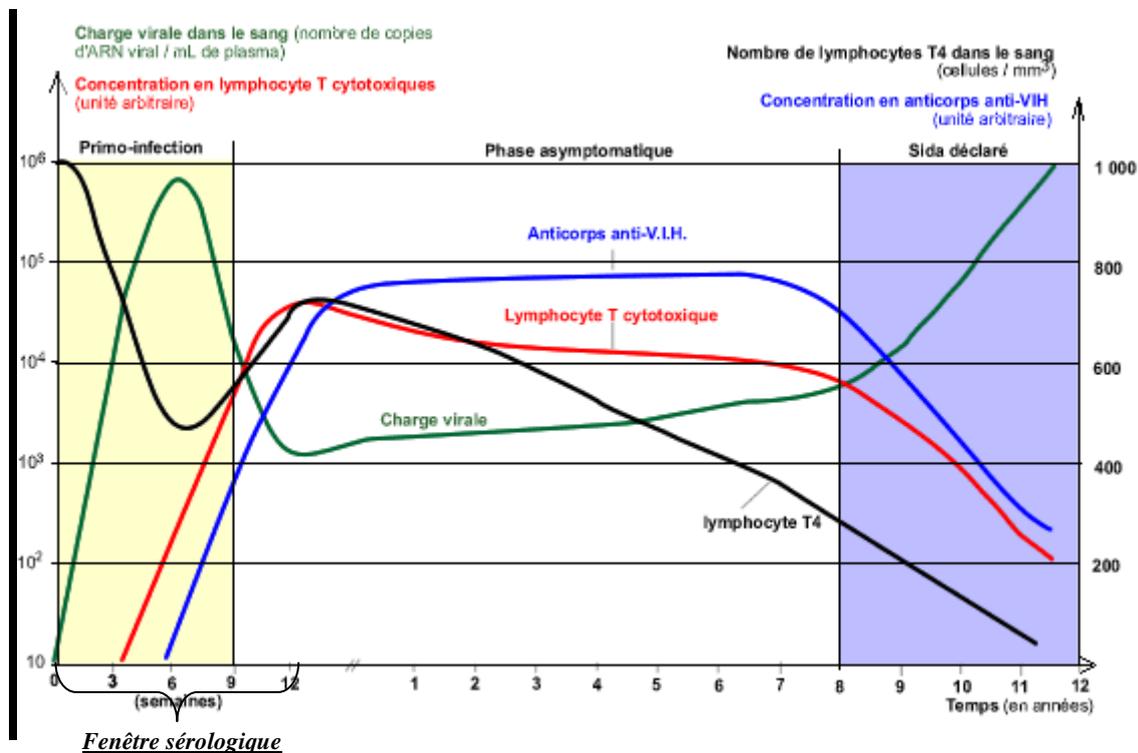


Figure 6 : Evolution de la CV et des CD4 durant les différentes phases de l'infection à VIH/sida.

7) Epidémiologie de VIH [1] :

❖ Dans le monde :

Aujourd'hui, environ 35 millions de personnes (fourchette : 32,2 - 38,8 millions) vivent avec le VIH, ce qui représente 1,2% de la population mondiale âgée de 15 à 49 ans, (Figure 6).

L'Afrique subsaharienne est la région du monde où le VIH est le plus répandu avec plus de 60% des cas.

A l'échelle mondiale, le nombre de nouvelles infections à VIH continue à diminuer. En 2012 2,3 millions de nouvelles infections à VIH ont été enregistrées [1,9 million-2,7 millions]. Il s'agit du chiffre annuel le plus faible et jamais enregistré, de nouvelles infections, depuis la deuxième moitié des années 1990, lorsqu'environ 3,5 millions de personnes [3,3 millions-4,1 millions] contractaient une infection à VIH chaque année.

Le nombre d'infections à VIH a diminué de plus de 50 % dans 26 pays entre 2001 et 2012 et entre 25 % et 49 % dans 17 autres pays.

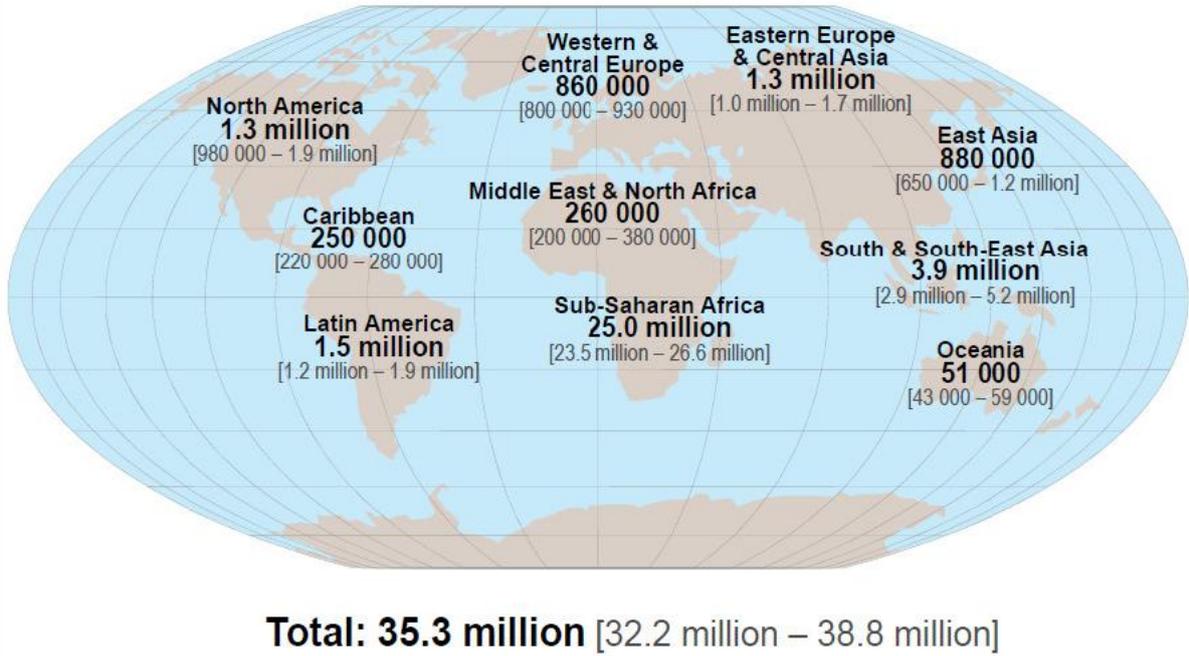


Figure 7 : Estimation du nombre d'adultes et d'enfants vivant avec le VIH en 2012 (rapport ONUSIDA, novembre 2013)

❖ Au Maroc plus de 30000 personnes sont séropositives d'après les données fournies par le ministère marocain de la santé.

a) Distribution de l'infection à VIH selon l'âge.

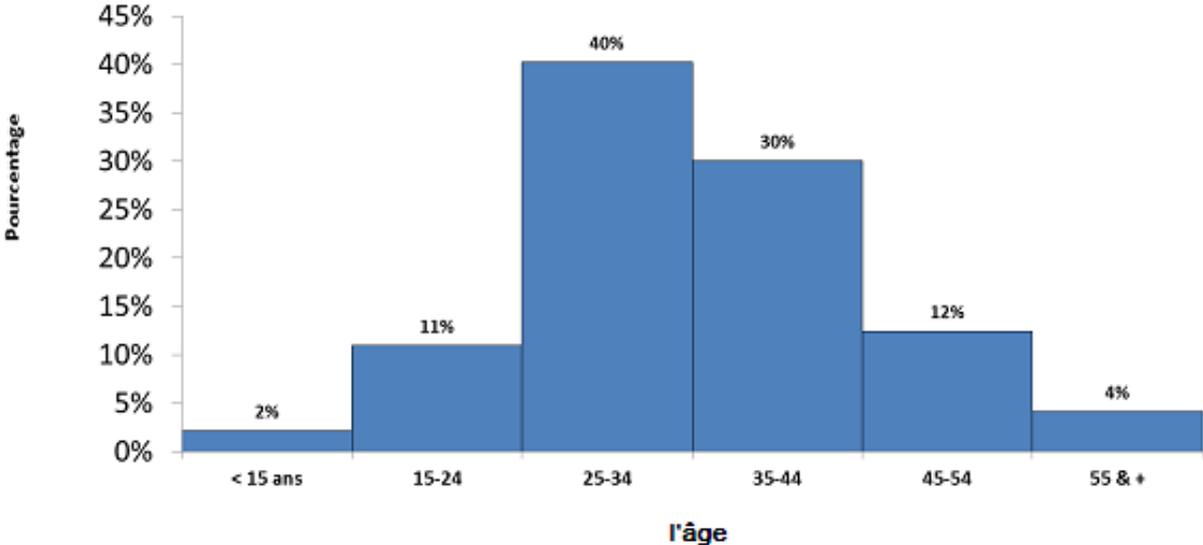


Figure 8 : Distribution des cas VIH-Sida selon l'âge au Maroc

⇒ 51% des cas dont l'âge est déterminé sont âgés entre 15 et 34 ans.

b) Répartition de l'infection à VIH selon le sexe.

Au Maroc, selon le ministère de la santé [8], la distribution des cas VIH selon le sexe, est illustrée dans la figure 9.

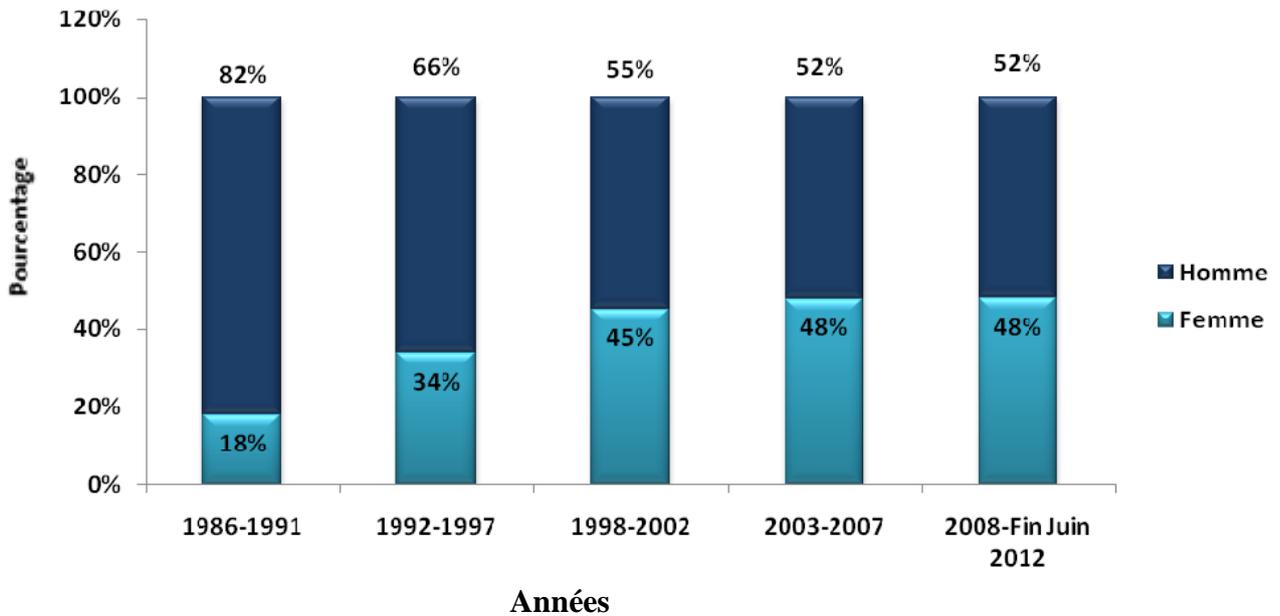


Figure 9 : Distribution des cas VIH-Sida selon le sexe au Maroc.

⇒ on remarque que le taux des femmes infectées connaît une augmentation depuis l'apparition de VIH au Maroc.

c) Distribution géographique du VIH au Maroc.

La distribution géographique de l'infection à VIH se fait de façon inégale dans les différentes régions du Maroc.

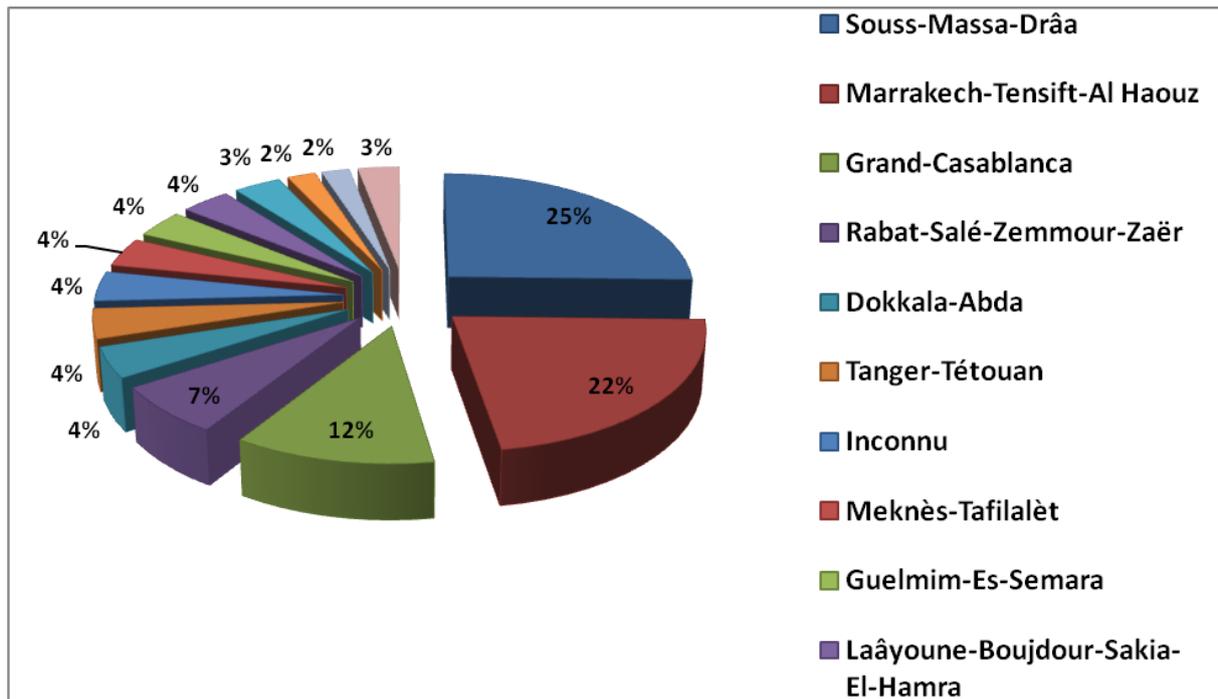


Figure 10 : Distribution géographique de VIH au Maroc

Les trois régions du Maroc les plus touchées et qui représentent plus de 50% des cas sont la région de souss-massa-Daraa (25%), suivie de la région du Marrakech (22%) puis le grand Casablanca (12%).

8) Transmission du VIH et prévention [9]:

❖ La transmission par voie sexuelle :

C'est le mode de transmission le plus fréquent dans le monde (85 à 90 % des infections par le VIH), survenant lors des rapports sexuels non protégés.

Le VIH, présent dans le sperme et les sécrétions vaginales, peut être transmis à l'occasion d'un rapport hétérosexuel ou homosexuel avec un partenaire infecté par VIH.

Il existe des facteurs favorisant la transmission du VIH par voie sexuelle :

- premier rapport sexuel,
- état avancé et gravité de la maladie, en pratique $CD4 < 200/ mm^3$ •
- tout rapport dans un contexte de saignements (règles.),
- Les rapports oro-génitaux sont potentiellement contaminants, mais à moindre risque.

La prévention de la transmission sexuelle repose d'abord sur des changements de comportements : abstinence, fidélité mutuelle au sein du couple, utilisation du préservatif (masculin ou féminin), lutte contre les infections sexuellement transmissibles (IST). En cas

d'exposition sexuelle accidentelle au VIH, il est possible de prescrire, à condition de le faire précocement, une prophylaxie post-exposition utilisant une combinaison d'antirétroviraux.

❖ **Transmission par voie sanguine :**

Le risque transfusionnel est actuellement sous contrôle dans la majorité des pays dont le Maroc fait partie.

Ce mode de transmission du VIH s'applique à des sujets s'exposant à du sang potentiellement contaminé de façon accidentelle ou non. Ainsi, ce risque est augmenté chez les toxicomanes, les transfusés et les professionnels de santé. Ces derniers étant susceptibles d'être en contact direct avec du sang d'une personne contaminée.

Ainsi, chez les toxicomanes, l'estimation du risque d'une contamination par l'usage de drogues injectables est de 0,67%.

Un personnel soignant, victime d'accident exposant au sang a un risque de contamination par le VIH. La aussi, une prophylaxie post-exposition, si elle est indiquée, permet de réduire significativement ce risque.

❖ **Transmission de la mère seropositive à son enfant (*verticale*) :**

Lors de la grossesse, le sang maternel communique avec celui du fœtus à travers le placenta. Le placenta se comporte comme un filtre naturel et permet de prévenir une contamination du fœtus dans 20 à 35% des cas.

La transmission du virus lors de l'accouchement est le premier mode de contamination chez le jeune enfant.

Lors de l'allaitement, le risque de contamination par le lait maternel est évalué entre 5 et 7%.

Le traitement prophylactique chez la femme enceinte avec accouchement par césarienne dans le cadre de la p TME permet de diminuer le risque à 1%. Enfin, le VIH a été retrouvé dans d'autres fluides biologiques tels que les larmes, l'urine ou encore la salive sans pour autant que des cas de transmission aient pu clairement être mis en évidence, du fait des faibles concentrations retrouvées.

9) Traitements [11] :

Le traitement ne peut être effectué que lorsque le nombre des lymphocytes CD4 est inférieur à $350/\text{mm}^3$. Le traitement de l'infection à VIH a pour objectif la réduction maximale de la réplication virale. Les ARV utilisés agissent au niveau des différentes étapes du cycle de réplication viral, on distingue :

9-1 Inhibiteurs d'entrée :

Il s'agit d'une molécule qui inhibe la fusion entre le virus et la cellule cible. C'est le seul antirétroviral administrable par voie sous cutanée, à raison de 90 mg (= 1ml) deux fois par jour, dans la partie haute du bras, l'abdomen ou la face antérieure des cuisses.

Exemple : Nevirapine.

9-2 Inhibiteurs de transcriptase inverse :

➤ **Les inhibiteurs nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI).**

Ce sont les premiers antirétroviraux développés. Ils sont actifs sur le VIH-1 et 2. Ils agissent par inhibition compétitive du nucléoside dont ils sont analogues.

Exemple : ZERIT.

➤ **Les inhibiteurs non nucléotidiques de la transcriptase inverse (INNTI).**

Ils ne sont actifs que sur le VIH-1.

Ils inhibent la transcriptase inverse du VIH-1 par liaison directe en perturbant le site catalytique de l'enzyme.

Exemple : INTELENC.

9-3 Inhibiteurs de l'intégrase du VIH :

Ils ne s'utilisent pas en première intention. Ils sont plutôt utilisés chez des patients déjà sous traitement, ayant une charge virale détectable. Ils sont utilisés à la posologie de 400 mg deux fois par jour en association avec d'autres ARV.

Troubles digestifs, vertiges, asthénie et arthralgie sont les principaux effets secondaires retrouvés.

Exemple : RALTEGRAVIR ou ISENTRES

9-4 Inhibiteurs de la protéase du VIH :

Les inhibiteurs de protéase sont actifs sur le VIH-1 et le VIH-2.

Les inhibiteurs de protéase agissent en inhibant la protéase, enzyme nécessaire à l'assemblage des protéines virales nouvellement synthétisées.

Ainsi, le blocage de cette étape de la réplication virale va conduire à la production des particules virales tronquées, incapables d'infecter des nouvelles cellules.

Exemple : NORVIR.

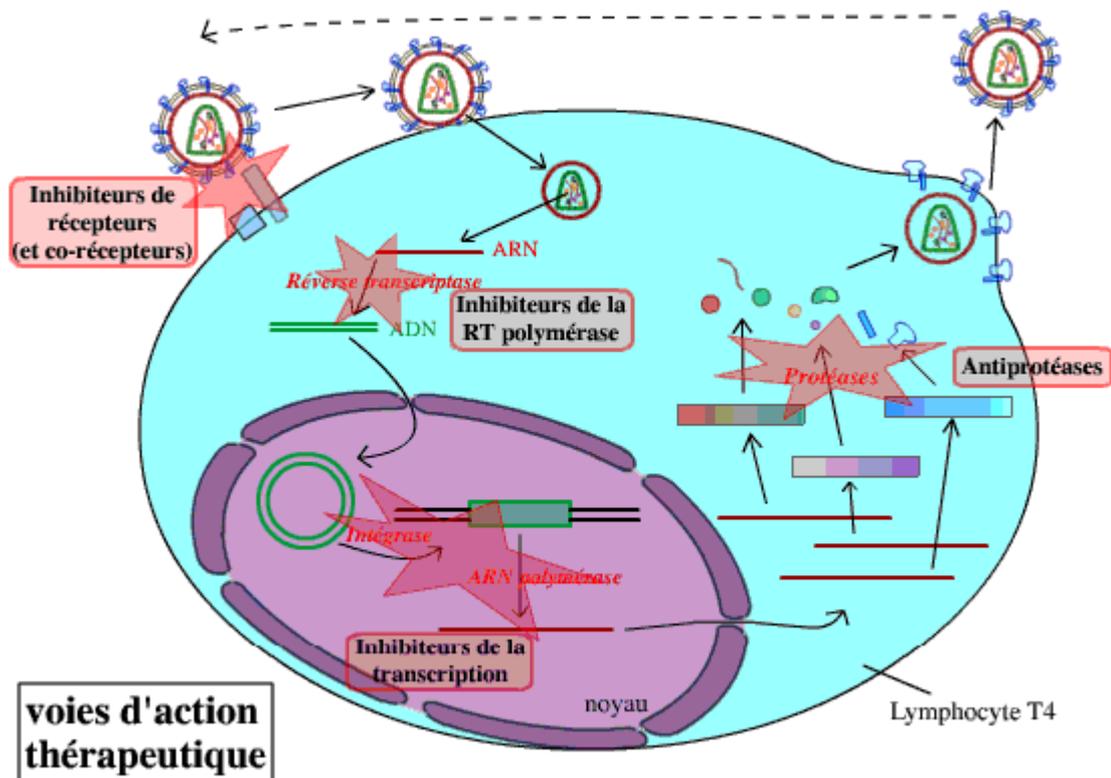


Figure 11 : Les voies d'action thérapeutiques des antirétroviraux.

10) *Prise en charge de l'infection à VIH au Maroc [12] :*

Le ministère de la santé (MS) s'est engagé très tôt dans la prise en charge des PVVIH à travers une stratégie claire, participative et réaliste.

En effet, dès 1988 le MS s'est investi dans la responsabilité du Programme National de Lutte contre le Sida (PNLS) avec l'association des efforts de la société civile.

La prise en charge de l'infection à VIH/ sida au Maroc a fait l'objet, en 1998, d'une circulaire ministérielle, mise à jour en 2001, en 2009 et 2010. Elle est venue formaliser les différentes avancées en matière d'organisation et de recommandations pour le traitement. Elle comporte, en plus des aspects organisationnels, les directives consensuelles ayant trait :

- au diagnostic et au suivi biologique de l'infection à VIH,
- à la prescription du traitement antirétroviral,
- à la prévention de la transmission de la mère à l'enfant (pTME),
- à la conduite à tenir en cas d'exposition au VIH,
- et à l'éducation thérapeutique.

Les centres de prise en charge: L'organisation actuelle de la prise en charge repose sur des Centres Référents de prise en charge situés dans des hôpitaux universitaires (Casablanca, Rabat, Fès, Marrakech), dans des hôpitaux régionaux (Agadir, Marrakech, Tanger, Oujda, Nador, Meknès) et dans certains hôpitaux militaires.

L'Association Marocaine de Lutte Contre le Sida, a été la cheville ouvrière de l'accès à la thérapie ARV. Dès l'année 2003, toute personne vivant avec le VIH et éligible à un traitement ARV avait accès gratuitement à ces médicaments. De plus, dès 1998, le personnel soignant a eu accès au niveau de tous les CR à la prophylaxie post-exposition en cas d'AES. Le suivi biologique fait appel aux deux examens clés que sont la numération des CD4 et la charge virale. Les patients ont accès gratuitement à ces tests de suivi biologique malgré le coût élevé supporté par le MS.

En 2005, l'INH (Institut National d'Hygiène) et l'IP (Institut de Pasteur) ont commencé à réaliser les génotypes de résistance qui permettent d'aider les prescripteurs d'ARV devant les situations d'échec thérapeutique.

MATERIEL &
METHODES

Le diagnostic biologique de l'infection à VIH peut se faire par deux méthodes différentes :

Méthode directe : basée sur la recherche du génome viral par PCR ou de la p24.

Méthode indirecte : basée sur la recherche des anticorps anti VIH par test ELISA, TDR ou par WB.

La chronologie de la positivité de ces tests est donnée dans la figure suivante

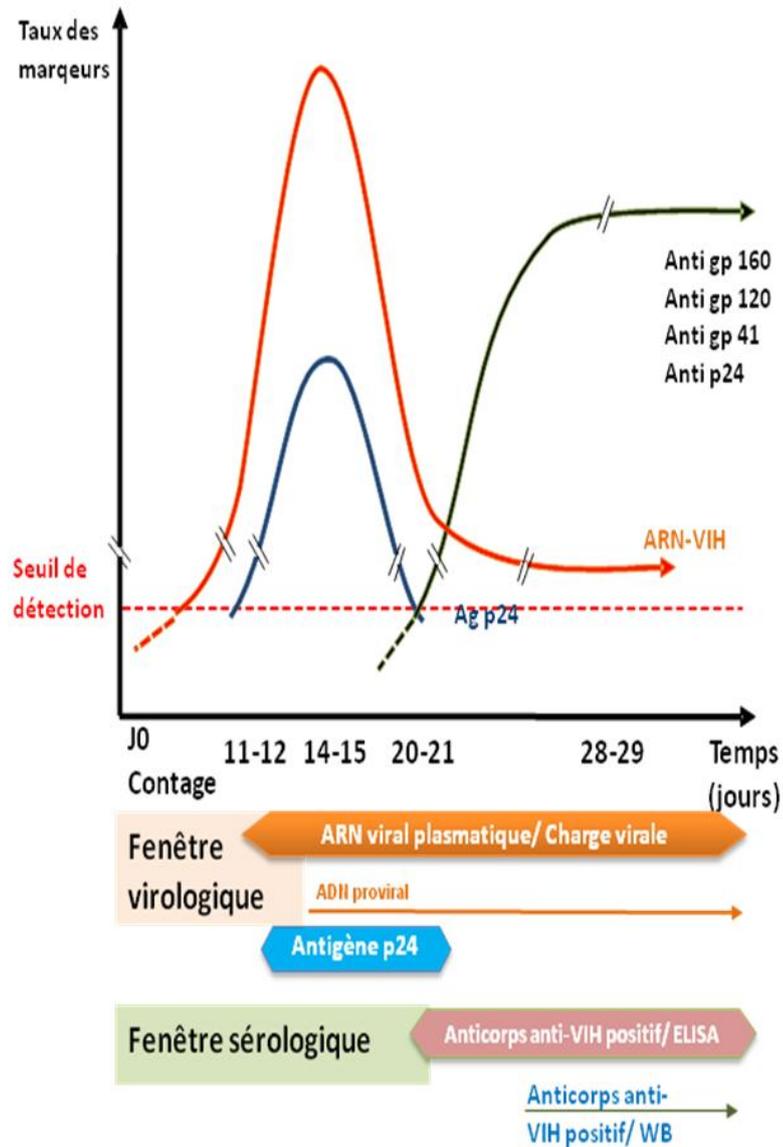


Figure 12 : La chronologie de la positivité des tests

1. Matériel

Les tests sont réalisés sur du sérum récupéré après centrifugation d'un prélèvement sanguin à 3500 tr/min pendant 5min, réalisé dans des flacons secs avec ou sans anti coagulants (EDTA) selon les recommandations du fabricant du réactif..

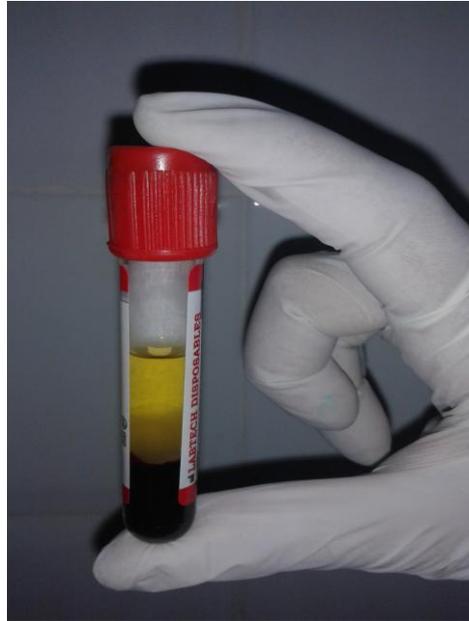


Figure 13 : Tube à essai avec du sang centrifugé.



Figure 14 : centrifugeuse Labafuge 400 .

2. Méthodes

a) **Test ELISA (Enzyme linked Immuno-Sorbent Assay) :**

Le test ELISA est une technique immunoenzymatique quantitative qui permet la détection et le dosage des antigènes et des anticorps. Ces derniers vont être fixés spécifiquement sur des

antigènes tapissant un support, et révélés par un second anticorps couplé à un enzyme qui va induire la coloration d'un substrat.

- **Mode opératoire :**

Les antigènes viraux, constitués par des protéines virales purifiées du VIH sont fixés au fond des puits d'une plaque en matière plastique (1). Les sérums à tester, les contrôles positifs et négatifs, sont déposés dans les puits (2). Les anticorps anti-VIH éventuellement présents se fixent sur les antigènes viraux. Après plusieurs lavages des puits pour éliminer tout ce qui n'est pas fixé, est rajouté un anticorps anti-immunoglobuline ou immunoconjugué. Ce dernier, qui reconnaît et se fixe sur l'anticorps anti-VIH, a été préalablement marqué par un enzyme (3). Les complexes antigènes/anticorps formés seront alors détectés par addition du substrat de l'enzyme (ou chromogène), qui donnera naissance à une réaction colorée (4). La coloration est traduite en densité optique par lecture avec un spectrophotomètre.

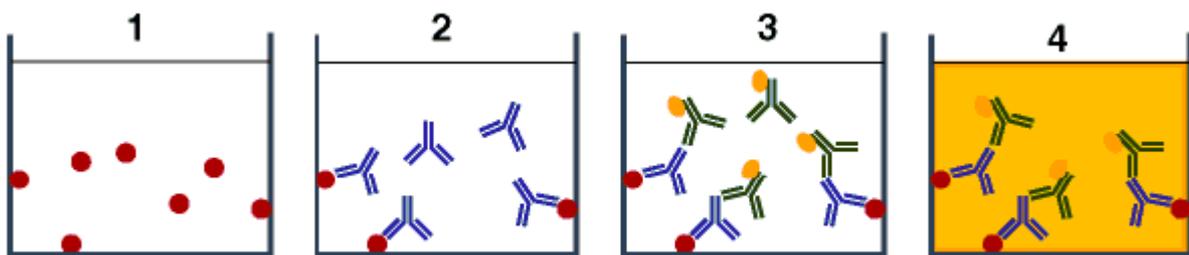


Figure 15 : Les différents étapes du test ELISA.

Les plaques ELISA se présentent sous forme de kits prêts à l'emploi « Voir annexe 6 ».

Vu le coût élevé de cette technique, le temps long de la manipulation, et le risque d'erreurs des dilutions, cette technique a été abandonnée au profit d'une autre technique plus simple qui est le Test de Dépistage Rapide.

b) Test de dépistage rapide (TDR) :

➤ **Principe biologique de la méthode :**

Le test de dépistage rapide VIH est un test unitaire qui permet d'[obtenir](#) un résultat rapide et ce, via la détection des anticorps anti-VIH, en moins de trente minutes.

Le nom commercial des bandelettes utilisées dans ce test est Alere Determine HIV-1/2. C'est une technique immuno chromatographique, elle est valable pour la détection qualitative à la fois des anticorps anti-VIH-1 et anti-VIH-2.

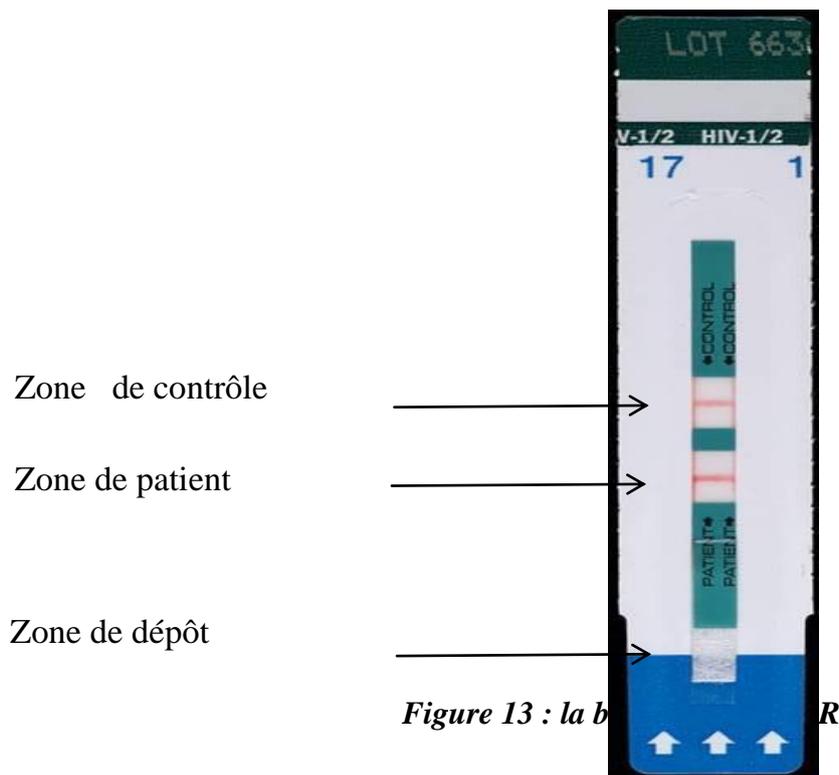


Figure 16 : la bandelette de TDR

L'échantillon est déposé sur la zone de dépôt, et migre par capillarité vers la zone de patient du conjugué (Antigène colloïde de sélénium) et se mélange avec ce dernier. Ce mélange continue à migrer à travers la phase solide jusqu'aux antigènes recombinants immobiles et jusqu'aux peptides synthétiques au niveau de la fenêtre-patient.

Si des anticorps anti-VIH-1 et/ou anti-VIH-2 sont présents dans l'échantillon, ils se lient au conjugué antigène (colloïdes de sélénium) et aux antigènes de la fenêtre-patient, formant ainsi une ligne rouge au niveau de la fenêtre-patient.

Si des anticorps anti-VIH-1 et/ou anti-VIH-2 sont absents, les colloïdes de sélénium traversent la fenêtre-patient et aucune ligne rouge ne se forme.

Une barre de contrôle de la procédure est incluse dans le dispositif afin d'assurer la validité du test.

➤ **Mode opératoire :**

Après avoir retiré la protection en aluminium de la bandelette, 50µl d'échantillon (sérum ou plasma) sont déposés à l'aide d'une pipette de précision au niveau de la zone de dépôt de l'échantillon. Les résultats seront lus après au moins 15 minutes (max 60 minutes).

Pour les échantillons de sang total (ponction veineuse) 50µl d'échantillon sont déposés à l'aide d'une pipette de précision au niveau de la zone de dépôt de l'échantillon.

Après une minute, une goutte de tampon de fixation est ajoutée sur la zone de dépôt de l'échantillon. Les résultats seront lus après au moins 15 minutes.



Figure 17 : Etapes de test rapide

➤ **Résultats de TDR :**

○ **Validation de test :**

La validation du test se traduit par l'apparition d'une ligne rouge dans la barre de contrôle comme indiquée dans la figure 15.

○ **Interprétation des résultats :**

- **Test positif :**

Des barres rouges apparaissent dans la fenêtre-contrôle et la fenêtre-patient sur la bandelette. Toute couleur rouge visible dans la fenêtre-patient doit être interprétée comme un résultat positif.

- **Test négatif :**

Une barre rouge apparaît dans la fenêtre-contrôle de la bandelette, et aucune barre rouge n'apparaît dans la fenêtre-patient.

- **Test non valide :**

Si aucune barre rouge n'apparaît dans la fenêtre-contrôle de la bandelette, même si une barre rouge apparaît dans la fenêtre-patient, le résultat n'est pas valable et le test doit être répété.



Figure 18: les différents résultats de TDR.

⇒ Si **TDR** s'avère positif, un test de confirmation par le Western Blot sera effectué « voir annexe 4 stratégie de diagnostic de l'infection à VIH ».

➤ **Comparaison TDR et test ELISA :**

Les nombreux avantages des tests simples/rapides par rapport à l'ELISA ont rendu possible leur utilisation à une échelle beaucoup plus large et dans beaucoup d'environnements. Ils n'exigent pas une infrastructure de laboratoire très sophistiquée. Ils sont maintenant largement utilisés à tous les niveaux de prestation des soins de santé dans les secteurs public et privé. Leur simplicité et leur capacité à fournir le même jour les résultats du VIH les rendent convenables pour une utilisation dans les programmes CDV et PTME.

Avantage des tests simples/rapides :

➤ Sensibilité/spécificité comparables au test ELISA

- Facilité d'emploi
- Pas de réactifs à reconstituer
- Facilité de conservation des kits.
- Réalisable en tout lieu et tout endroit.
- Stockage à température ambiante.
- Nécessitent moins d'expertise pour leur réalisation par rapport à ELISA.
- Ne nécessite pas d'équipement pour traiter l'échantillon.
- Coût faible.
- Accessibilité sur le marché.
- Augmente l'accessibilité aux structures offrant le dépistage.
- Augmentation du nombre de sites où le test est disponible.
- Résultat en un temps < 30 minutes : Counseling et diagnostic le même jour.

c) **La technique du Western Blot (WB)**

1. Principe :

Il s'agit de la méthode de confirmation de référence. Les protéines d'un lysat viral VIH-1 ou VIH-2 sont d'abord séparées les unes des autres par électrophorèse, avant d'être transférées sur une membrane de nitrocellulose.

Les différentes protéines qui constituent le virus, vont être reconnues par des anticorps spécifiques présents dans le sérum et vont former des bandes révélées par une réaction immuno-enzymatique. « Voir annexe 3 »

Le WB est une technique qualitative qui permet la détection des anticorps IgG anti-HIV-1 et anti HIV-2 dans le sérum ou le plasma humain.



Figure 19 : l'ensemble des réactifs utilisés dans le WB.

Ce coffret MP HIV BLOT 2.2 est fourni par la société MP Biomédical.

La quantité de réactifs nécessaires selon le nombre de bandelettes est résumée dans le tableau

1. « Voir annexe 1 »

2. Protocole expérimental :

Le test de WB se déroule de la façon suivante :

Les bandelettes nécessaires, sont disposées dans les puits des racks à l'aide d'une pince, (1 bandelette pour chaque échantillon). Il faut prévoir 3 bandelettes pour les témoins (Négatif, Positif faible et Positifs fort).

2ml de la solution de lavage^[a] sont ensuite ajoutés dans chaque puits et laissés sous agitation 1 à 2 minutes. Après aspiration de la solution de lavage, 2 ml de la solution d'incubation^[b] sont ajoutées dans chaque puits.

Dans chaque compartiment,

*20 µl de témoin négatif^[e]

*20 µl de témoin positif faible^[f]

*20 µl de témoin positif fort^[g]

*et 20 µl d'échantillon sont ajoutés successivement,

Une incubation dans un agitateur tridimensionnel pendant 1 nuit (16-20 heures) à température ambiante et réalisée.



Figure 20 : l'agitateur 3D des racks

Remarque : La technique étant très sensible, une microgoutte de sang est suffisante pour donner un résultat positif. Il faut faire attention à la contamination inter-échantillons.

Après cette incubation, le couvre plaque est retiré avec précaution de façon à éviter de mélanger les échantillons. La plaque est inclinée pour aspirer le mélange des puits. Il faut changer l'embout de l'aspirateur pour chaque échantillon afin d'éviter toute contamination croisée. Après cette incubation, les compartiments sont lavés 3 fois avec 2 ml de la solution de lavage diluée, et incubés 5 minutes sous agitation. 2 ml de la solution conjugué^[d] sont ajoutés dans chaque puits et incubés 30 minutes sous agitation à température ambiante. Les compartiments sont ensuite lavés 3 fois comme précédemment. Cette étape est suivie de l'addition de 2ml de la solution substrat^[h] prête à l'emploi, dans chaque puits.

Une incubation sera réalisée pendant 15 minutes sous agitation, en surveillant l'apparition des bandes et en prenant soin de ne pas les laisser noircir.

Les bandelettes sont rincées avec de l'eau distillée à 3 reprises afin d'arrêter la réaction. Ces dernières sont ensuite séchées.

Les bandelettes sont finalement collées dans le registre après les avoir identifiées.

3. Résultats de WB :

➤ **Validation de test :**

- **Remarque :** les bandelettes révélées doivent être totalement sèches afin d'éviter toute erreur d'interprétation.

- La bande correspondant au contrôle du dépôt sérique doit être visible sur toutes les bandelettes. En l'absence de cette bande, les résultats doivent être considérés comme invalides du fait d'une erreur technique telle que l'oubli de l'échantillon, du conjugué ou du substrat.
- Pour le contrôle négatif, aucune bande spécifique au VIH-1 ou au VIH-2 ne doit apparaître, la bande correspondant au contrôle du dépôt sérique doit être visible ;
- Pour le contrôle positif fort, toutes les bandes spécifiques du VIH-1, (les p17, p24, p31, Gp41, p51, p55, p66, Gp120 et Gp160) ainsi que la bande spécifique au VIH-2 doivent être visibles.
- Pour le contrôle faiblement positif, les bandes Gp160/Gp120, p24 et/ou Gp41 doivent apparaître.
- L'interprétation de la bandelette sera ensuite basée sur la présence de bandes spécifiques selon les recommandations des autorités compétentes (à savoir le ministère de la santé, l'OMS, ONUSIDA,...).

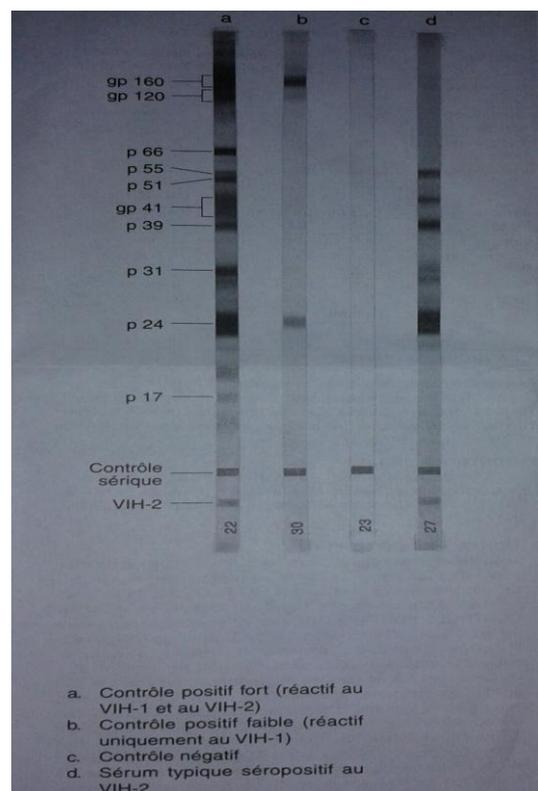


Figure 21 : les différents résultats de WB.

4. Interprétation des résultats :

- Un sérum est considéré positif s'il renferme au moins 2 bandes parmi celles correspondant aux p24, Gp41, Gp120/ Gp160.
- Un sérum est considéré négatif s'il ne montre aucune bande ou s'il y a une bande p17 isolée.

- Un sérum renfermant un profil différent à ceux d'un profil négatif et d'un profil positif est considéré comme profil indéterminé.
- Un sérum renfermant la p24 et la Gp160 est en faveur d'une séroconversion.
Ces critères d'interprétation sont recommandés par le fabricant du test, cependant il existe d'autres critères en fonction des organisations savantes et des pays. « Voir annexe 2 »
- **Remarque :** l'extrémité numérotée des bandelettes doit être dirigée vers le bas comme indiqué sur la figure 18, c'est-à-dire que les bandes Gp120/Gp160 doivent être en position distale par rapport à l'extrémité numérotée.

Il existe une autre technique de confirmation qui est l'Immuno-Blot. La principale différence entre les deux techniques repose sur l'utilisation de protéines recombinantes (spécifiques de VIH1 et VIH2) et/ou de peptides synthétiques déposés en ligne sur une bandelette, alors que le Western-Blot utilise des protéines virales natives purifiées, séparées par électrophorèse. La présence de bandes témoins sur chaque bandelette pour l'immunoblot permet une interprétation individuelle et indépendante de chaque échantillon.

RESULTATS & DISCUSSION

1- Le nombre de test ELISA réalisé au LBM durant l'année 2012 :

Une étude rétrospective sur le nombre de patients qui ont réalisé un test ELISA au LBM au cours de l'année 2012 a été réalisée.

Tableau 1 : Le nombre de test ELISA « VIH » pour l'année 2012

	NOMBRE	POSITIF
JANVIER	2	0
FEVRIER	0	0
MARS	0	0
AVRIL	4	1
MAI	5	1
JUIN	12	4
JUILLET	0	0
AOUT	6	0
SEPTEMBRE	4	0
OCTOBRE	3	0

NOVEMBRE	16	5
DECEMBRE	23	5
TOTAL	75	10

2- Le nombre de TDR réalisé au LBM durant les années 2013 et 2014 :

Une étude rétrospective sur le nombre de patients qui ont réalisé un TDR au LBM au cours de l'année 2013 et 2014 a été réalisée.

Tableau 2 : Le nombre de TDR VIH pour l'année 2013 et 2014

	NOMBRE 2013	POSITIF 2013	NOMBRE 2014	POSITIF 2014
JANVIER	17	5	7	1
FEVRIER	21	5	9	1
MARS	25	2	14	0
AVRIL	27	8	16	0
MAI	13	1	12	2
JUIN	17	5		
JUILLET	7	1		
AOUT	7	1		
SEPTEMBRE	18	7		
OCTOBRE	26	3		
NOVEMBRE	18	1		
DECEMBRE	22	1		
TOTAL	218	40	58	4

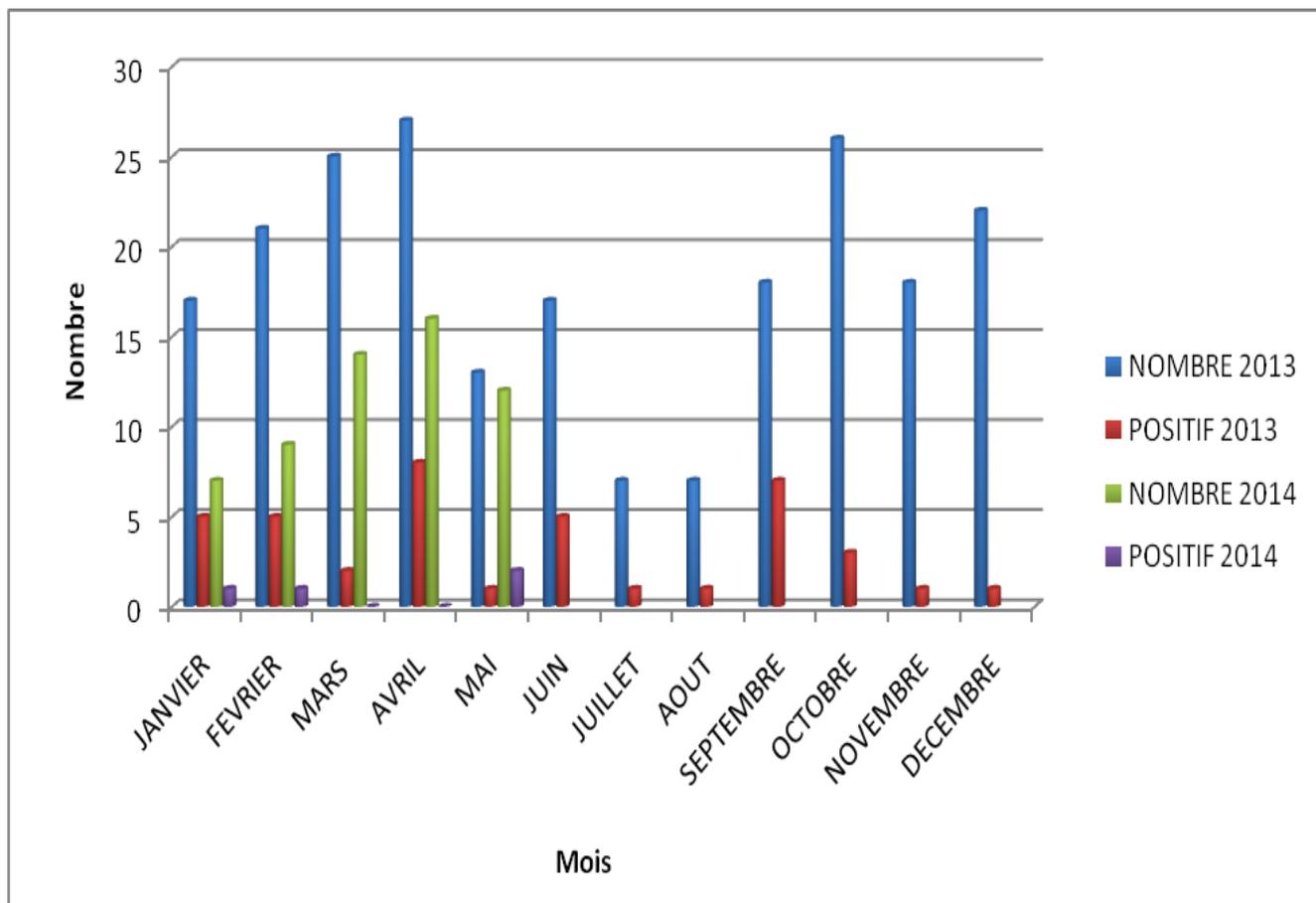


Figure 22 : le nombre de TDR VIH positif par mois durant l'année 2013 et 2014

A partir de cette étude, on constate que le nombre de TDR réalisé au laboratoire « 2013-2014 » est plus élevé que celui du test ELISA. 75 tests ELISA en 2012 contre 218 TDR en 2013, soit trois fois plus. Cette étude confirme que la facilité et la rapidité de TDR, permettent l'augmentation du nombre de demande.

Il faut noter que le fait que le TDR est un test unitaire, un seul échantillon est suffisant, par contre le test ELISA nécessite une série d'au moins 4 échantillons.

Tableau 3 : Le nombre de TDR positif depuis 2012 :

	TDR négatif	TDR positif
Le nombre de TDR	297	54
% des TDR	84,62%	15,38%

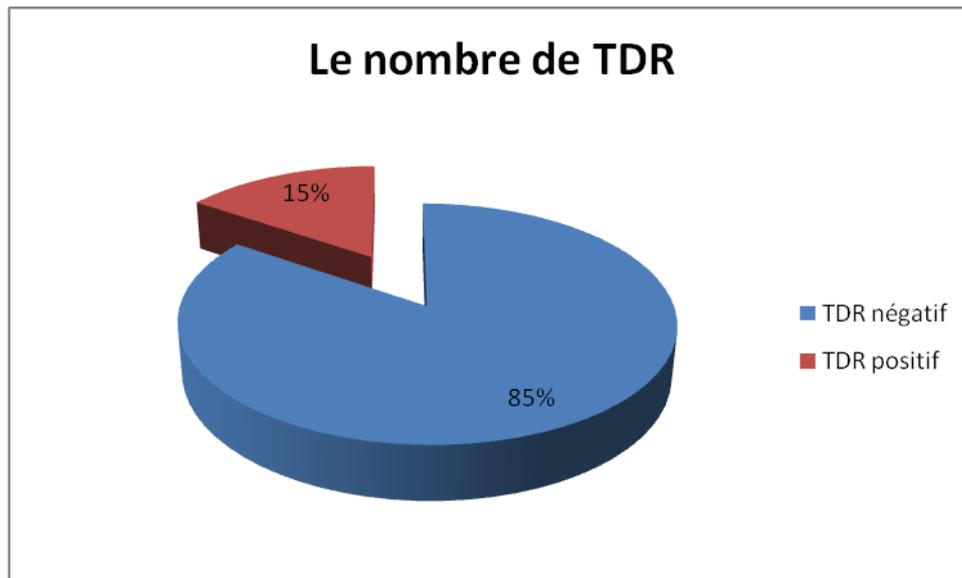


Figure 23 : le pourcentage des cas de TDR négatifs et positifs enregistrés dans les années 2012 et 2013.

Sur les 351 prélèvements reçus 74 ont été positifs pour le VIH, soit 15.38 %. Ce pourcentage élevé est dû au fait que la majorité de nos tests sont demandés par les médecins référents dans le cadre de dépistage. Ces tests sont généralement demandés dans le cas où le patient présente une symptomatologie évoquant l'infection à VIH (une diarrhée chronique + hypotrophie, une lymphopénie, Une miliaire Dyspnée + fièvre 40 °C, une tuberculose pulmonaire, les accidents d'exposition au sang (AES), une mycose buccale, une thrombopénie + Méningite, une anémie, une candidose œsophagienne), et dans le cas des patients déjà dépistés et pour lesquels on demande une confirmation par WB, selon les recommandations de la stratégie de diagnostic.

3- La confirmation par WERTERN BLOTT :

Suivant la stratégie de diagnostic « Voir annexe 4 » tout patient dépisté est envoyé au laboratoire pour confirmation. En premier lieu, le test TDR est refait dans le but d'éviter une erreur sur le prélèvement ou sur la personne « cas des campagnes de dépistage massive ». Effectivement, dans le LBM, trois cas de patients dépistés comme séropositifs, se sont révélés négatifs après répétition du test:

- Un cas dépisté dans un centre de santé.
- Un cas dans le cadre de la surveillance sentinelle : il s'agit d'un prélèvement envoyé de la province de khenifra pour confirmation par WB, mais le TDR et la technique ELISA ont donné un résultat négatif.

- Un cas envoyé du centre de transfusion et d'hémovigilance, dans le cadre d'un don de sang. le dépistage de l'infection à VIH, VHB, VHC et la syphilis est systématique. Il s'agit d'un jeune homme âgé de 20 ans adressé par le CRTS « Centre Régional de Transfusion Sanguine » au médecin référent pour confirmation de l'infection à VIH, mais les tests réalisés au laboratoire par TDR et par ELISA ont donné un résultat négatif.

La demande de test WB en fonction des renseignements cliniques :

Tableau 4 : Le nombre de tests WB en fonction des renseignements cliniques :

Surveillance Sentinelle	KAPOSI	LYMPHOPENIE	Altération de l'état général	Immuno dépression	DEPISTAGE VOLONTAIRE	TOTAL
1	1	4	5	5	58	74

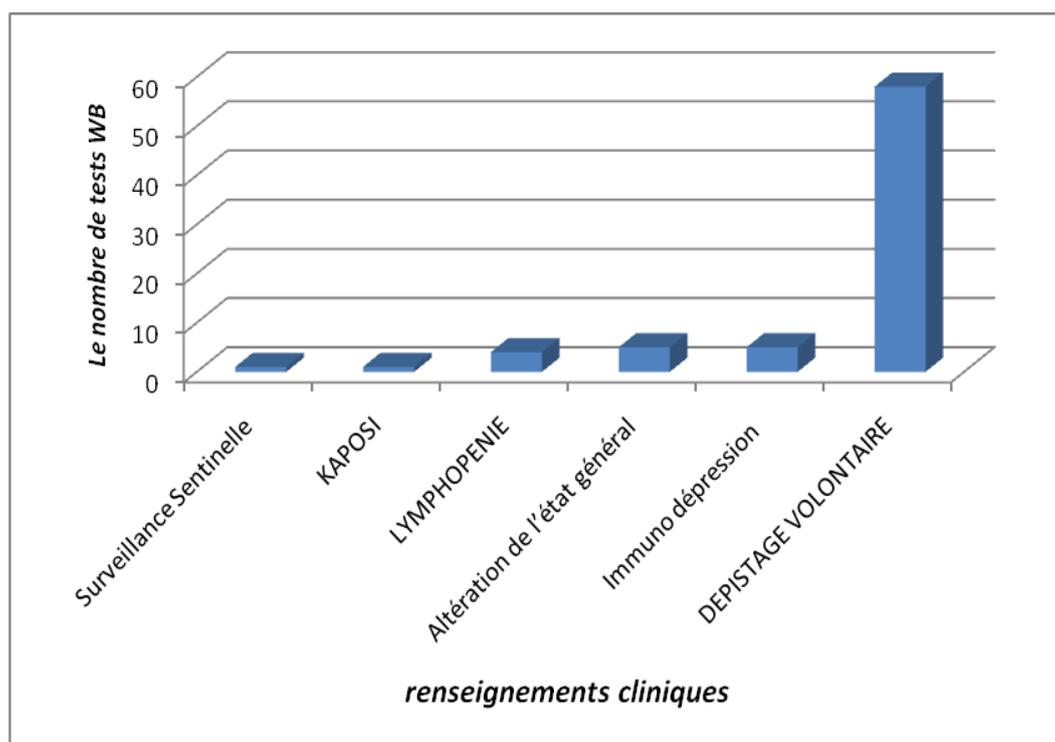


Figure 24 : Le nombre de tests WB en fonction des renseignements cliniques

Comme le montre cette étude, 58 patients « soit plus de 81% » sont dépistés dans le cadre des campagnes de dépistage volontaire organisé par le ministère ou par les ONG. En effet, depuis le début d'utilisation du TDR, une nette augmentation des cas séropositifs asymptomatiques a été notée. Cela est dû à la nouvelle stratégie du ministère de la santé dans le cadre de promouvoir et proposer le test de dépistage volontaire dans les centres de santé et les maisons

d'accouchement. Cette stratégie va permettre une amélioration de la prise en charge et de la prophylaxie, car les patients sont dépistés avant le stade SIDA maladie.

Le nombre de cas de confirmation par WB :

Depuis l'installation de la technique de confirmation par WB dans le LBM du CHR Mohamed V en juillet 2012, le laboratoire a effectué 74 tests dont 4 sont négatifs soit un pourcentage de 5.40%.

Il s'agit de quatre patientes de sexe féminin recrutées dans le cadre d'une campagne de dépistage volontaire, une par l'ALCS, l'autre par un centre de santé et les autres sont des femmes enceintes dans le cadre de la p TME.

Les quatre patientes ont été suivies après 3 mois et après 6 mois par le WB et le test s'est avéré toujours négatif.

De ces données, on peut conclure que le WB est un test de confirmation indispensable, surtout dans les pays de faible prévalence comme le Maroc

Conclusion:

Ce rapport a permis de faire le point sur l'épidémiologie du VIH, les différents modes de transmission, les techniques de diagnostic et les traitements disponibles.

La technique de TDR qui a été utilisée en 1^{er} temps de diagnostic, présente plusieurs avantages dans la mesure où elle donne des résultats rapides, elle est facile à utiliser, réalisable en tout lieu, et donne des résultats satisfaisants en termes de sensibilité et de spécificité lors de la phase chronique de l'infection.

Le manque de sensibilité dans les phases précoces de l'infection à VIH « la fenêtre sérologique » représente l'inconvénient de TDR.

Le WB est la méthode de confirmation du diagnostic de l'infection à VIH.

Un blot négatif n'offre pas la garantie que le virus du SIDA n'est pas présent, bien qu'un blot positif en anticorps du VIH-1 indique la présence d'une infection par le virus. Dans le cas d'un BLOT négatif ou indéterminé, il est recommandé de renouveler le test sur le prélèvement d'origine et sur des échantillons consécutifs. Les patients doivent être retestés sur un nouveau prélèvement après trois et six mois.

L'avantage de cette technique se résume dans la facilité de lecture grâce à la présence de bandes témoins. Elle permet aussi de différencier entre une infection à VIH 1 et VIH2.

L'inconvénient majeur de ces trois méthodes TDR, ELISA et WB dites de diagnostic indirect c'est qu'elles sont non utilisables pour le diagnostic de l'infection à VIH chez les enfants de moins de 18 mois laissant ainsi la place à la méthode de diagnostic direct qui consiste en la recherche du génome viral par PCR.

Annexes:

Annexe 1

Tableau 6: Réactifs nécessaires en fonction du nombre de bandelettes.

Réactifs	Nombre de bandelettes utilisées						
	3	4	5	6	7	9	15
Tampon dilué au 1/20 (ml) (sol1)	60	70	80	100	120	140	240
Tampon de blotting dilué au 1/10 (ml) (sol2)	20	20	40	40	40	60	80
Poudre de blotting ^[c] (g)	1	1	2	2	2	3	4

Solution de conjugué (ml)	7	9	11	13	15	19	31
Conjugué (ml)	7	9	11	13	15	19	31
Substrat	7	9	11	13	15	19	31

Annexe 2

Tableau 7 : critères d'interprétation du WB en fonction des organisations

Organisation	Critères d'interprétation positive des tests WB
Association of State and Territorial Public Health Laboratory Directors / Centers for Disease control (ASTPHLD/CDC),1989 USA	Au moins 2 bandes parmi p24, Gp41, Gp120,Gp160
Centre National de Transfusion Sanguine 1990	2 bandes ENV avec GAG ou POL
OMS	2 bandes ENV avec ou sans GAG ou POL
Consortium for Rétrovirus Serology standarization –CRSS 1988 USA	Une bande ENV avec p24 ou p31
Croix rouge Américaine 1988 USA	GAG, POL, et ENV, une bande de chaque
Chinese Centre for Disaese Control and Prévention (CCDCP) 2004 chine	2 bandes ENV ou une bande ENV avec p24
National and Reference Lboratories (NRL) 1987 australie	Une bande ENV avec au moins une des bandes GAG ou POL
Société allemande de lutte contre les maladies virales (DVV)	Une bande ENV avec au moins une bande GAG, POL.

Annexe 3

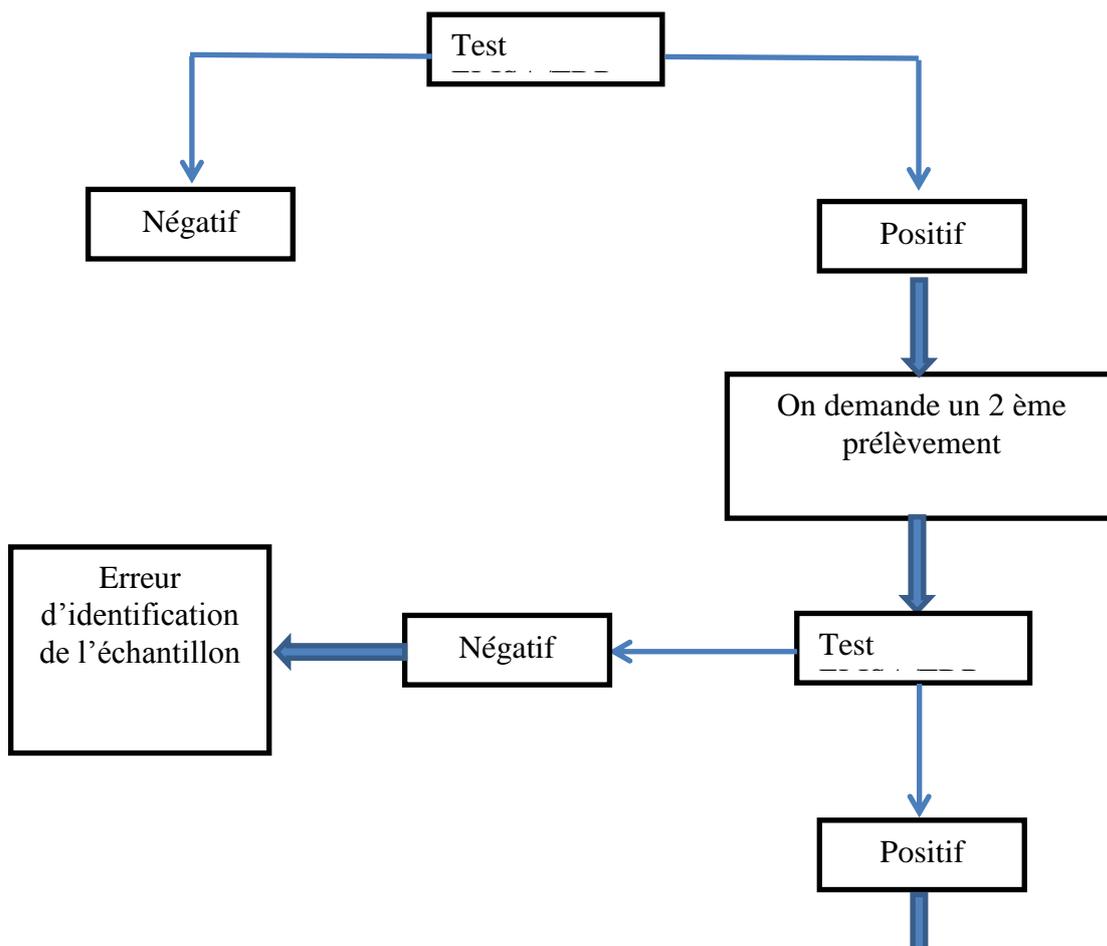
Tableau 8: corrélation entre les différentes bandes (antigènes) et leur poids moléculaire

Poids moléculaire	Gène	Antigène	Description
Gp 160	ENV	Forme polymérique de GP41	Glycoprotéine Bande large,

			diffuse
Gp120	ENV	Extra membranaire	Glycoprotéine Bande diffuse
p66	POL	Transcriptase inverse	Bande étroite
p55	GAG	Protéine précurseur	Bande étroite
p51	POL	Transcriptase inverse	Bande étroite juste en dessous de p55
p39	GAG	Fragment de p55	Bande étroite
Gp41	ENV	Transmembranaire	Glycoprotéine diffuse
p31	POL	Endonucléase	Double bandes
p24	GAG	Protéine nucléocapside	Bande large
p17	GAG	Protéine nucléocapside	Bande large

Annexe 4

Stratégie de diagnostic de l'infection à VIH



Annexe 5 : Composition des réactifs pour le WB :

[a] : solution mère : Tampon Tris contenant du Tween 20. Contient du Thiomersal comme conservateur.

[b] : Tampon d'incubation : Tampon Tris contenant du sérum normal de chèvre inactivé par chauffage. Contient du Thiomersal comme conservateur.

[c] : Poudre de blotting : Lait écrémé déshydraté.

[d] : Conjugué : Anti-IgG humain de chèvre conjuguée à de la phosphatase alcaline. Contient de l'azide de sodium comme conservateur.

Références bibliographiques

[1] : rapport de l'ONUSIDA sur l'épidémie mondiale de SIDA 2013. PDF.

[2] : <http://french.cri.cn/621/2013/12/02/102s356011.htm>

[3] : Fleury Hervé J-A. et al., 1997. Virologie humaine. Deuxième édition. Édition Masson.

[4] : Pierre HIDREAU. et al., 2006. L'épidémie du VIH/SIDA et sa situation dans un pays en voie de développement : le Bénin. Thèse de doctorat.

[5] : Gilles Furelaud., Benjamin Pavie. et al., 2005. Les *retroviridae*. www.snv.jussieu.fr.

[6] : Le cycle du VIH, www.ac-versailles.fr, visité le 25-04-05.

[7] : <http://www.vihservices.fr/quest-ce-que-le-vih/histoire-naturelle-du-vih>.

[8] : [http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourresponse/countryprogressreports/2012countries/ce_MA_Narrative_Report\[1\].pdf](http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourresponse/countryprogressreports/2012countries/ce_MA_Narrative_Report[1].pdf)

[9] : Les modes de transmission du SIDA., www.sida-info-service.org.

[10] : http://www.itg.be/internet/elearning/written_lecture_fr/8_la_variabilit_du_vih_cont1.html

[11] : Anne-Laure MARCHANDOT. et al., 2011. Le virus de l'immunodéficience humaine et ses traitements : évaluation des connaissances des pharmaciens d'officine de lorraine. Thèse de doctorat.

[12] : http://data.unaids.org/pub/report/2008/jc1348_morocco_response_highlights_fr.pdf