

UNIVERSITE KASDI MERBAH-OUARGLA
FACULTE DE SCIENCES DE LA NATURE ET DE VIE
DEPARTEMENT DE SCIENCE BIOLOGIQUES



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention d'un

MASTER ACADEMIQUE

Domaine : Science biologiques

Filière : biologie

Spécialité : Microbiologie appliquée

Présenter par :

KAHI Nadjat

Karama Radjat

Thème

***Diagnostiques sérologiques du VIH par la
technique ELISA***

Soutenu publiquement le :

06 /07/2021

Devant le jury :

KHALLEF .S	MCA	Président	U .K.M.Ouargla
LATI .I	MAA .U	Encadreur	U.K.M.Ouargla
BOUDJENAH. S	Professeur	CO-encadreur	U .K.M.Ouargla
DJELLOUL DAOUDJI. S	MAA	Examinatrice	U.K.M. Ouargla

Année universitaire : 2021/2022

The background of the page is decorated with several large, soft-focus pink flowers, likely peonies, scattered across the light grey background. The flowers are in various stages of bloom, with some showing detailed petal textures and others appearing as gentle blurs.

Remerciement

Nous tenons d'abord à remercier Allah Qui nous a donné la force de réaliser ce modeste travail

A Mme KHLLEF SAKINA. Qu'elle nous a honoré d'avoir accepté de présider les membres de jury, merci infiniment ...Vous êtes toujours un symbole de sagesse et de gentillesse

Nous remercions aussi Melle DAOUADJI Djelloule S. d'avoir accepté généreusement d'examiner ce modeste travail

Nous tenons à remercier sincèrement Docteur LATI Ibtissam et le professeur BOUJENAH .S qui en tant que, directeurs de mémoire, elles se montraient à l'écoute et la disponibilité tout au long de la réalisation de ce travail. Les conseils qu'elles nous ont prodigué, la patience, la confiance qu'elles nous ont témoignés dans la réalisation de notre travail de recherche

Au chère Laborantine BABA HAMO Mariam Sonia, Vos conseils étaient toujours très pertinents

Nous tenons à remercier vivement les techniciens de laboratoire de CDR de l'EPH –Ouargla ainsi que Docteur RAHAMNI AMINE, spécialiste en Immunologie, Laboratoire centrale de l'EPH -Ouargla

Nous remercions également tous les enseignants de département de sciences biologiques spécialité microbiologie appliquée de l'université d'Ouargla.

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude

L'amour, les respects, la reconnaissance

Aussi, c'est tout simplement que



Je dédie

A mon très cher père

Pour m'avoir soutenu moralement et matériellement jusqu' à ce jour , pour son amour , et ses encouragements .Que ce travail , soit pour vous , un faible témoignage de ma profonde affection et tendresse .Qu' Allah le tout puissant te préserve ,t'accorde santé , bonheur et te protège de tout mal.

A ma très chère mère

Autant de phrases aussi expressives soient –elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j éprouve pour toi, Tu m'as comblé avec la tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études .Qu'ALLH te protège donne la santé, le bonheur et longue vie.

A mon frère et mes sœurs

Vos avez été à mes cotes pendant toutes les étapes de mes études, je vous en suis très reconnaissante

L'encouragement, les conseils et les soutiens que vous m'avez apporté étaient et reste la bouffée d'oxygène qui me ressourçait dans les moments pénibles

Quoique je puisse dire et écrire, aucune dédicace ne peut exprimer la profondeur des sentiments fraternels et d'amour, d'attachement que j'éprouve à votre égard

Je vous dédie ce travail en témoignage de ma profonde affection en souvenir de notre indéfectible union qui s'est tissée au fil des jours j'espère ne jamais vous décevoir, ni trahir votre confiance et vos sacrifices .Je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès .Puisse dieu vous protéger garder et renforcer notre fraternité

Ames amies

*Fatima Rouai et Abayahia Maroua
Barka itab et Khakha Halima Sadia
Gomine Abla et Meriem Rouai*

Sans oublier tout les professeurs que ce soit du primaire, du moyen, du secondaire ou de l'enseignement supérieur

Nadjat

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma reconnaissance.

Je dédie ce travail:

A

Mes Parents, mes frères et mes sœurs Pour tous leurs sacrifices, leurs soutiens, Leurs encouragements et leurs amours qui ont t la raison de ma réussite.

A

Les techniciens dans laboratoire pour leurs patience et guidance, et tous les travailleurs au service CDR d'hôpital Mohamed Boudiaf

Radja

Listes des abbreviations

ABO-I: ABO- incompatible

Ac: Anticorps

ADCC: Antibody- dependent Celle - Mediated Cytotoxicity

ADN : Acide désoxyribonucléique

AES: Accident d'une exposition au sang

Ag: Antigen

AIDS: Acquired Immunodéficiency Associated virus

ALV: Avian Leukosis Virus

An-AC : Antisérum anti –espèce contre l'espèce donneuse AB

Anti-AB : Antisérum anti –espèce contre l'espèce donneuse AC

AP : phosphatase alcalin

ARN : Acide ribonucléiques

ARNm: Acide Ribo -Nucléiques messenger

ARNt Lys 3: Acide Ribo -Nucléiques Lys 3

ARNt: Acide Ribo -Nucléiques transfert

ARV: Anti- Rétroviraux

AZT: Azido- Thymidine

C°: Incubation

CCR5: C-C chemokin receptor type 5

CD4: Cluster of differentiation 4

CD8: Cluster of differentiation

CDC: Centre for disease control

Cm: centimètre

CMH: Complexes major d'histocompatibilité

CTL: lymphocyte T cytotoxique

CXCR4: Chemokin α (X-C motif) receptor

Da: Dalton

DDC: Didanosine

E3: Éstriol

EDSM : Enquête démographique et de la santé de Mali

EIA : Dosage immunologique enzymatique

ELISA : Enzym -Linked - Immunosorbent Assay

Env : Envelope

FAD: Food and drug

FCR: Force centrifuge relative

FLAC: Fluorescence -Linked -Immunsorbent Assay

FSW: Female sex workers

Gag: Group antigens

Gly: Glycodélin

Gp: Glycoprotein

G-R-T-D: Gay related Immunodeficiency syndrome

HAS: Haute autorité de santé

HbA1C: Hémoglobine glyquée

HCG: Hormone chorionique gonadotrophine humaine

HERV: Rétrovirus endogène humain

HFV: Human Immunodeficiency virus

HLA: Human leukocyte antigen

HLTV: Human Tlymphotropic virus

HSH: Homme ayant des rapports sexuels avec les hommes

IBBS: Enquête bio-comportementale intégrée

IFN α : Interleukine alpha

IFN β : Interleukine beta

IFN γ : Interleukine gamma

IgG: Immunoglobuline G

IgM: Immunoglobuline M

IL: Interleukine

INI: Inhibiteurs d'intégrase

INNTI: Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse

INTI: Inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse

IP : Inhibiteurs d'intégrase

Kd: Kilodalton

KSV: Kaposi Sarcoma virus

LH: Hormone Lutéinisante

LNR: Laboratoire national de référence

LTR: Long Terminal Repeat

MENA: Middle East and North Africa

MSM: Men who have sex mem
MSPRH: Ministère de la sante de la population et de la réforme hospitalière
MSW: Men who have sex work
MTS: Maladies sexuellement transmissible
N k: Natural killer
Nm: Nanomètre
OIM: Organisation International pour la Migration
OMS: Organisation Mondial de la Santé
ONG: Organisation non gouvernemental
ONUSIDA: Organisation des Nations Unies sur VIH/SIDA
PAPP-A: Protéine Plasmatique Associée à la grossesse
PBS: Pri mer Briding Site
P-LGT: Facteur de croissance de type placentaire
Pol: polymérase
PrEP: Prophylaxies – pré- expositions
PS: Professionnelle de sexe
PV VIH: Personnes Vivant avec le VIH
Ram: Révolution minute
READ: Lecteur de couleur au spectrophotomètre
Rev: Régulations d'expressions
RIA: Radio immuno précipitation
RT: Reverse transcriptase
S: Substrat
SARS COV – 2: Coronavirus associée au syndrome répertoire sévère
SIDA: Syndrome Immuno- Déficience Acquise
SIV: Simian Immuno- déficience Acquise
TARV : Traitement Anti- Rétroviral
TIE: Test Immuno- Enzymatique
TLR: Toll lik receptor
TNF: Tumor necrosis factor
TORCH: Toxoplqsmose other infection Rubeole cytomegalovirus herpes complex
TROD: Test rapide d'orientation de diagnostiques
TSF : Travailleur du sexe femme
UDS : Utilisation d'drugs injectable

UDU : Union démocratique unioniste

VEGF: Facteur de croissance endothélial vasculaire

Vif: Virus infectivity factor

VIH: virus immunodéficiência humaine

VIS: Virus immunodéficiência simienne

Vpr: Viral protein r

Vpu : Viral protéine u

Vpx : Viral protéine x

WASH: Etape de lavage

WB: Western blot

Liste des tableaux

Tableau 1.molécules par classes d'ARV actuellement disponibles (2017 et 2021) (Guide national de prise en charge thérapeutiques de l'infection VIH /SIDA et des infection opportunités de l'adulte et de l'enfant ., 2021).....	27
Tableau 2.Caractéristiques générales et opérationnelles des ELISA et des tests rapides (Carvalho MB et <i>al.</i> , 1996).....	خطأ! الإشارة المرجعية غير معرفة.
Tableau 3. Recommandations de l'OMS pour le choix de stratégies de dépistage de l'infection à VIH (Carvalho MB et <i>al.</i> , 1996)	خطأ! الإشارة المرجعية غير معرفة.
Tableau 4.Caractéristiques des différentes générations des tests ELISA anti VIH (Peng J et al .,2014)	49
Tableau 5.comparaison entre les types des tests ELISA et les avantages et Inconvénient Agut H et al.,2014)	60
Tableau 6.L'identification et conservation des compositions de trousse ELISA (Barre S, 1983).	67
Tableau 7.La fiabilité dépistage (Delfraissy J-F,1999).....	72
Tableau 8.Les germes des faux positif et négatif.....	73
Tableau 9.Séroprévalence de l'infection VIH chez les populations clés en 2019.....	39
Tableau 10.Représentation des décès au sida en 2020 (bilant d'activités des centre de référence de prise en charge de l'infection a VIH/SIDA ., 2020).....	40
Tableau 11.Représentation de Nombre de professionnelles du sexe séropositif au VIH en 2020 (bilant d'activités des centre de référence de prise en charge de l'infection a VIH/SIDA ., 2020).....	41
Tableau 12.Représentation de Nombres d'homme ayant des relations sexuelles avec des hommes séropositif du VIH en 2020 (bilant d'activités des centre de référence de prise en charge de l'infection a VIH/SIDA ., 2020)	41
Tableau 13.Représentation de Nombre d'usagers de drogues injectables séropositifs au VIH en 2020 (bilant d'activités des centre de référence de prise en charge de l'infection a VIH/SIDA ., 2020).....	42
Tableau 14.Représentation de Nombre de détenus séropositifs au VIH en 2020 (bilant d'activités des centre de référence de prise en charge de l'infection a VIH/SIDA ., 2020)	42
Tableau 15.Réparation des personnes nouvellement infectés avec le VIH selon tranche d'âge	98

Liste des figures

Figure 1. Arbre phylogénétique illustrant l'origine simienne du VIH-1 (Mourez T et <i>al.</i> , 2013).....	10
Figure 2. Arbre phylogénétique des rétrovirus basé sur l'alignement des séquences de la RT et. IN (Denis F et <i>al.</i> ,1989).....	13
Figure 3. Structure du VIH-1 et VIH-2 (Sahasini M., 2009).....	14
Figure 4. Organisation génétique du VIH-1 ET VIH-2(Sirany K ., 1993)	17
Figure 5. Cycle de réplication du virus l'immunodéficience humaine	18
Figure 6. Carte représentant la distribution géographique de sous du VIH-1(Plantier JC et <i>al.</i> ,2009).....	20
Figure 7. Diversité génétique du VIH sont représentes les 4 groupes du VIH-1 (M ,N,O ,P) les 9 sous types du groupe M(A,B,C,D,E,F,G,H,I,J,K) , les relation phylogénétiques avec le SIV de différent ainsi que celles avec le VIH-2 et de ses 8 sous types majoritaire (Plantier JC et <i>al.</i> ,2009).....	21
Figure 8. Activation de TCD8+ après la reconnaissance d'un peptide du VIH par CMH I (Youssoufi F., 2019).....	23
Figure 9. La réponse lymphocytaire contre le VIH. (Youssoufi F., 2019).....	24
Figure 10. Phases de l'évolution de l'infection à VIH, en absence de traitement(Youssoufi2F ., 2019).	26
Figure 11. Survenue des infections opportunistes en fonction du nombre de lymphocytes TCD4. (Girad PM et <i>al.</i> , 1996)	26
Figure 12.. Différents étapes de test ELISA direct	52
Figure 13.. Différents étapes de test ELISA indirecte (Engavall et perlman ,1971)	54
Figure 14Double anticorps sandwich ELISA direct (Ling et Overby, 1972).....	55
Figure 15. ELISA double sandwich.....	56
Figure 16. Doubl antigen bridging assay	57
Figure 17. ELISA compétition entre antigène de référence et antigène et d'échantillon	58
Figure 18.Dosage d'antigènes (Fisher J et al ., 2001).....	59
Figure 19. Dosage d'anticorps (Fisher J et al ., 2001)	59
Figure 20. Courbe standard d'ELISA (Crowther JR .,2009).....	68
Figure 21.La structure de la p24 (Fred the Oyster, 2014).....	69
Figure 22.La structure de l'immunoglobuline IgG (Person JM ,1978).	70
Figure 23.antigène IgG dans ELSA	70

Figure 24. La structure de l'immunoglobuline IgM (Person JM ,1978).....	71
Figure 25. IgM capture ELISA	71
Figure 2.6 La cinétique des marqueurs du VIH-1 (Ivens KO et <i>al.</i> , 2016)	74
Figure 27. Les estimations générales de l'infection VIH selon les régions d'OMS) (Christine Rouzioux ML ., 2003)	32
Figure 28. Nombre de personne nouvellement infectées au VIH selon OMS.....	32
Figure 29. Prévalence l'infection VIH dans le monde (Lanerie J ., 2017)	33
Figure 30. Evolution du nombre estimé de PVVIH en Algérie 2000-2018	36
Figure 31. Evolution du taux d'incidence estimé du VIH chez les 2 genres Algérie 2000-2018	36
Figure 32. Evolution des taux d'incidence p. 100000 du VIH en Algérie chez les 2 genres de 2010 à 2019 (Source LNR)	37
Figure 33. Evolution des cas cumulés de séropositifs et de sida en Algérie de 2010 à 2019 (Source LNR)	37
Figure 33. Evolution des taux d'incidence spécifique par âge du VIH en Algérie de 2010-2018 (Source LNR)	38
Figure 34. L'appareil de la centrifugation et les tubes centrifugés.	88
Figure 35. Kit ELISA pour la diagnostiques de VIH	88
Figure 36. Préparation de la microplaque.....	89
Figure 37. Distribution de contrôle négative et positive et échantillons.....	89
Figure 38. La microplaque couverte. (Après l'ajoute d'échantillon)	90
Figure 39. L'incubateur de la microplaque et la microplaque.	90
Figure 40. La microplaque dans un appareil de lavage.	91
Figure 41 La distribution de conjuguées dans la microplaque.	91
Figure 42. la microplaque couvert (après l'ajoute de conjuguées) et incubateur.	92
Figure 43. La distribution de la solution de chromogène A et chromogène B dans la microplaque.....	92
Figure 45. Après l'incubation et lavage deux solution de chromogène.....	93
Figure 46. L'ajoute de solution de stop dans la microplaque.	93
Figure 47.. L'appareil de lecture de la microplaque.	94
Figure 48. Résultat du test ELISA	97
Figure 49.. Réparation des personnes nouvellement infectés avec le VIH selon le sexe.	120

Sommaire

Les listes d'abréviations.....	
Liste des tableaux.....	
Liste des figures	
Sommaire	
Introduction.....	1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIE

CHAPITRE I : Généralités sur le VIH

1. Découvert de virus	6
2. Origine	10
3. Définition du VIH.....	11
4. Définition du SIDA.....	11
5. Caractères généraux.....	11
6. Classification et taxonomie.....	12
7. Structure du virus.....	13
7-1.La particule virale.....	13
7-2. La nucléocapside	13
7-3. Enveloppe viral.....	14
7-4.Glycoprotéines.....	14
8. Structure du génome virale	14
8-1.Les gènes des classiques (structure)	15
8-1-1.Le gène gag ;	15
8-1-2.Le gène Pol ;.....	15
8-1-3.Le gène env ;	15
8-2 .Les gènes des supplémentaire (régulation).....	15
9 .Cycle de multiplication.....	17
9 -1.Mécanisme d'entré du virus dans les cellules	17
9-2. Cycle de réplication.....	17
11. Propriétés biologiques du VIH	19
11. Propriétés physico-chimiques du VIH.....	19

12. virulence.....	19
13. La variabilité génétique	20
13-1.VIH-1.....	20
13-2.VIH-2.....	20
14. Les cellules cibles	21
15. La réponse immunitaire anti VIH	21
15-1.Les éléments du système immunitaire.....	22
15-2.La réponse innée.....	22
15-3.Réponse adaptatif	23
16. Physiopathologie du VIH.....	24
16-1.Les voies de transmission du VIH.....	24
16-1-1.Transmission par voie sexuelle	24
16-1-2.Transmission par voie sanguine	24
16-1-3.Transmission mère – enfant	25
16-2.Histoire naturelle de l'infection par VIH.....	25
16-2-1.La primo-infection (phase séroconversion)	25
16-2-2.La phase asymptomatique (ou phase de latence clinique 7à10 ans)	25
16-2-3.Le stade SIDA (phase symptomatique).....	26
17. Traitement antirétroviral	27
18. Prévention	28

CHAPITRE II : Epidémiologie de l'infection à VIH

1. Epidémiologie.....	31
1-1.Epidémiologie dans le monde	31
1-2.Epidémiologie du MENA.....	33
1-2-1.Groupes à haut risques	33
1-2-1-1.Les consommateurs de drogues injectables et le VIH	33
1-2-1-2.Les HSH et le VIH.....	34
1-2-1-3.Les travailleuses du sexe et le VIH.....	34
1-3.Épidémiologie de VIH en Algérie :.....	35
1-3-1.Selon les données du LNR	37
1-3-2.Situation de l'épidémie au sein des populations clés.....	38
1-3-3.Situation de l'épidémie a VIH au sein des populations en contexte de vulnérabilité.....	39
1-4.Epidémiologie de VIH dans la Wilaya d'OUARGLA.....	40

CHAPITRE III : ELISA et VIH

1. Définition d'ELISA	44
2. Découverte de test ELISA (Evolution des immuns essais jusqu'à.....)	45
3. Evolution du test ELISA	48
3-1.En fonction de l'antigène.....	49
3-2. En fonction du mode de révélation de l'anticorps.....	50
3-3.En fonction du type d'anticorps recherché	50
3. Principe générale.....	50
4 .Principes de la technique ELISA pour les maladies infectieuse.....	51
5. Les différents types d'ELISA.....	51
5-1.Techniques d'ELISA direct.....	51
5-2.Technique d'ELISA indirecte.....	52
5-3.Technique de l ELISA sandwich	54
5-3-1.Dosage d'antigène	54
5-3-1-1.Dosage d'un antigène par méthode sandwich (sandwich direct).....	54
5-3-1-2.Dosage d'un antigène par la méthode du double sandwich (sandwiche indirect)	55
5-3-2.Dosage d'anticorps.....	56
5 - 4 .Techniques d'ELISA compétition.....	57
6. Les avantages et les inconvénients des types ELISA	59
7. Les avantages et inconvénients de la technique.....	62
7-1.Avantages	62
7-2.Inconvénients.....	62
8. Composition du kit ELISA	62
9 .Les différents éléments du test.....	66
10. Condition de conservation et manipulation	67
11. Les résultats d'ELISA	67
11-1.Quantitatif.....	67
11-2.Qualitatif.....	68
11-3.Semi-qualitatif	68
11-4.Courbe standard.....	68
11-5.Modèles de courbe d'étalonnage	68

12 .Biomolécules ciblées	69
12-1 .Concernant l'antigène p24	69
12-2.Détection d'immunoglobuline G	69
12-3 .L'immunoglobuline M	70
13. La fiabilité de dépistage	71
14. Les germes des faux positif et faux négatif	72
15. Les limites de détection d'ELISA	73
15-1. Cinétique des marqueurs sériques au cours de l'infection à VIH-1	73
15-2.Reaction croisées	74
16. Application de la technique ELISA	74
16-1.Diagnostic biologique.....	74
16-2.Développement de vaccins	76
16-3.Immunologie.....	76
16-4.Surveillance des médicaments et industrie pharmaceutique	76
16-5.Transplantation	76
16-6.L'industrie alimentaire	77
17-1.Les contrôles positifs	77
17-2.Les contrôles négatifs	77
18 .Limite de détection (LOD)	78
19 .Précision.....	78
20.. Source d'erreurs.....	78
20-1. Dépannage	79

CHAPITRE V : Matériel et méthodes

1-Lieu d'étude.....	85
2-Présentation du centre :	85
3-Type et période d'étude	85
4-Population d'étude.....	85
4-1.Les critères d'inclusion.....	85
4-2.Critères d'exclusion.....	85
5-Les supports des données	86
6-Les aspects éthiques	86
7-Équipement du test.....	86

8-Composition de la trousse	86
9-Principe du test utilisé	87
10-Méthode	87
11-Limitations du test utilisé	94

CHAPITRE VI : Résultats et discussion

1-Résultats	97
1-1.Résultats de l'étude sérologique :	97
1-2. Résultats de l'étude épidémiologique :	98
1-2-1.Répartition selon le sexe	98
1-2-2.Selon la tranche d'âge	98
1-3 .Discussion.....	99
Conclusion	102
Références bibliographiques	104
Annexes	115

Introduction

Introduction

L'infection à VIH est un défi majeur pour le système de santé mondial ; il s'agit d'une pandémie extraordinaire aussi bien par son caractère urgent (1^{ère} cause de mortalité d'origine infectieuse depuis les années quatre-vingt) que par son impact socio-économique. Malgré les moyens financiers croissants et l'implication politique de plus en plus large, l'épidémie continue à avancer plus vite que la riposte mondiale (**OMS ,2008**).

Cette maladie est due à un virus appelé VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), ce dernier est un rétrovirus de la famille des Lentivirus dont 2 types ont identifiés à ce jour (VIH 1 et VIH2) (**Montagnier L ., 1982**).

Depuis le diagnostic du premier cas de VIH/SIDA en Algérie, l'épidémie a grandement évolué au cours du temps .On peut dire qu'après plus d'un quart de siècle de surveillance, l'Algérie demeure un pays de faible prévalence mais elle se concentre actuellement dans certaines populations clés (**DGPPS ,2013**). .

Le dépistage du VIH se réfère aux techniques et outils utilisés pour déterminer la présence ou l'absence du VIH. Différentes méthodes cherchent à identifier et / ou à mesurer les diverses molécules liées du VIH dans le corps, comme les anticorps du VIH, les antigènes du virus ou l'ARN viral.

.**En 1985**, les premiers tests de dépistage de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) étaient mis à disposition deux ans après l'identification du virus responsable de la pandémie la plus mortelle de l'histoire du **XXe siècle**. Les premiers tests utilisés étaient basés sur le principe des méthodes ELISA en présence de protéines natives du virus.

La techniques ELISA actuellement concurrencés par des tests chromatographiques dits rapides (TROD) qui permet de diagnostiquer le VIH (détecter les anticorps anti-VIH-1 anti-VIH-2) dans quelques minutes.

Dans le cas où le test ELSA donne un résultat positif, ce résultat doit être suivi obligatoirement par un test de confirmation dit western blot (**Theze J ,2000**). .

L'intégration d'un test dans l'algorithme du dépistage national de l'infection VIH demande une évaluation de la faisabilité et de l'efficacité de ce test. Cette efficacité est susceptible de varier en raison de la diversité des souches virales circulantes (**Mohammdi K., 2017**)

Notre travail comporte deux parties :

- ✓ Partie une théorique, cette partie comprend quatre chapitre dont :
 - * chapitre une : généralité sur le virus immunodéficience humaine (VIH).
 - * chapitre deux : épidémiologie de l'infection du VIH.
 - * chapitre trois : ELISA et VIH
- ✓ Partie deux est la pratique
Cette partie comprend deux chapitre :
 - Matériel et méthode.
 - Résultat et discussions.

Objectif général

Etudes de diagnostiques sérologiques du VIH par techniques ELISA en CDR (centre de référence de prise en charge d'infection VIH) aux niveaux de l'hôpital Mohamed Boudiaf.

Objectif secondaire

- La sensibilité et la spécificité de teste ELISA pour diagnostiqué le VIH.
- La performance et la surveillance de test ELISA pour diagnostiqué le VIH.
- Décrire Le profile épidémiologie d'infection VIH/SIDA' durent de période d'étude.
- Démontre les démarches de diagnostiques sérologiques de VIH par ELISA.

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIE

Chapitre I :

Génitalité sur le virus immunodéficience humaine

1. Découvert de virus

Le VIH (virus de l'immunodéficience Humaine), responsable du syndrome d'immunodéficience acquise.

Tout **début en 1981** quand le docteur **Michael Gottlieb** de l'université de Californie à Los Angeles eut surprise d'observer en moins de 3 mois quatre malades d'une trentaine d'années souffrant d'une pneumonie à pneumocystiscarini et ayant tous pour point commun l'homosexualité (**Gottlieb M., 1988**)

❖ Le 5 juin 1981

- ✓ Aux Etats Unis d'Amérique à Los Angeles les premières descriptions appelées syndrome d'immunodéficiences acquises « SIDA » sont rapportés par le « center of disease control » d'Atlanta (**Chamaret S., 1999**)

❖ En 1982

- ✓ on a désignée sous le terme de G.R.I.D (gay related immunodeficiency syndrome) , celui d'AIDS (acquired immunodéficiency syndrome) était unanimement accepté .

❖ En mai 1983.

- ✓ Dans l'institut Pasteur par l'équipe du professeur **Luc Montagnier** a fait l'isolement du virus sous le nom de LAV (lymphoadenopathie associated virus) dans les cultures de lymphocytes T provenant d'un patient atteint d'un syndrome des lymphoadenopathie (**Barré et al., 1983**)

❖ En 1984

- ✓ **Safi-Gallo** et son équipe reconnaissent cent pourcent des patients atteints de SIDA positifs pour les anticorps anti HTLV 3 (human Tlymphotropic virus3) qui est identifié au LAV et rebaptisé VIH en juin 1984.(**Leport et al., 1996**)
- ✓ Introduction du western blot et identification de p24 comme protéine de moyen poids moléculaire.
- ✓ **KLATZMAN, CHERMAN, MONTAGNIER, COLUKMAN, COL** isolent sélectivement le LAV à partir des lymphocytes T4.
- ✓ **ZEGURY, GALLO, COL** découvrent le HTLV 3 à partir de culture des cellules infectées dans le sperme de deux patient atteints de SIDA. (**Leport et al., 1996 ; Kuiken C et al., 2000**)

- ✓ **KITCHEN, ESSEX, COL** identifient la gp120 confirmé après par l'équipe de MONTAGNIER..
- ✓ En novembre, l'activité antivirale de la 3' azido6desoxythymidine (AZT OU ZIDOVUDINE OU RETROVIR) est mise en évidence.

❖ **En 1985**

- ✓ La commercialisation du premier test de diagnostic sérologique et dans cette même année en février l'activité de la zidovudine vis-à-vis du VIH se confirme. (**Cassuto JP et al., 1996 ; Leport C et al., 1996**)
- ✓ **Barin et Col** ont montré qu'un autre rétrovirus simien le vis (virus de l'immunodéficience simienne : STLV) circulait en Afrique de l'ouest ; ce second virus du SIDA (ex HTLV4) est maintenant le VIH-2.
- ✓ **GALLO et COL** découvrent la présence du virus dans le cerveau
- ✓ **REDFIELD, GALLO, COL** décrivent la transmission sexuelle, la même année était établie la transmission verticale. (**Cassuto JP et al., 1996 ; Leport C et al., 1996**)

❖ **En mai 1986**

- ✓ Le comité international de la nomenclature et de la taxonomie attribue à ce son nom actuel « virus de l'immunodéficience humaine » en français (VIH) ou « human immuno- deficiency virus » en anglais (**Leport C et al., 1996**) .
- ✓ Le VIH-2 a été isolé dans un institut pasteur chez des patients originaires de l'Afrique de l'ouest en 1986, le VIH-1 connaît une vaste répartition mondiale et le VIH-2 est restreint à l'Afrique de l'ouest.
- ✓ **CLEVET, ALIZON** élaborent les caractéristiques et les séquences génétique du VIH.

❖ **En 1987**

- ✓ **BIBERFIELD** isola, chez des malades originaires de Gambie, un autre rétrovirus apparenté au virus simiens SBL6669, ce virus est également inclus dans le groupe VIH-2. (**Cassuto JP., 1996**)

❖ **EN 1988**

- ✓ La 4^e session de l'OMS à Genève a formellement prôné la confidentialité des examens et des tests et a conseillé aux états membres d'éviter toute discrimination envers les patients du SIDA pour ce qui concerne les soins, l'emploi et la liberté individuelle. (**Cassuto JP., 1996**)

❖ **En 1989**

- ✓ Conférence internationale à Paris sur les implications du SIDA pour la mère et l'enfant (**Leport C et al, 1996**)
- ✓ Début de l'essai thérapeutique de la zidodine versus placebo chez les sujets infectés par le VIH des groupes 2 et 3 du CDC

❖ **En 1992**

- ✓ Avril, début de l'essai Delta, comparant **AZT+DDI** et **AZT + DDC** à **AZT** en monothérapie (**Manifestations cliniques de l'infection par le VIH chez l'africain., 1998**).

❖ **En 1993 [10]**

- ✓ VII^e conférence internationale sur le SIDA à Berlin ; l'accent a été mis sur la prévention (**Patey O., 2001**).

❖ **En 1994**

- ✓ Conférence internationale sur le SIDA au Japon, le directeur de l'OMS adresse aux chefs d'états africains réunis à Addis Abeba un message pour qu'ils s'investissent davantage dans la lutte contre le SIDA sur le continent (**Patey O., 2001 ; Cassuto JP., 1996**).

❖ **En 1995**

- ✓ Découverte du kaposi Sarcoma virus (KSV)
- ✓ Septembre à la V^e conférence européenne sur les aspects cliniques et le protocole Delta démontrant la supériorité des bithérapies d'analogues de nucléosides sur la monothérapie par la zidovudine (**Cassuto JP., 1996**).

❖ **En 1996**

- ✓ Janvier, 11^e conférence internationale sur les rétrovirus et les infections opportunistes à Washington, mise en évidence d'une trithérapie incluant une anti-protéase ; **AZT-DDI-Indinavir** ou **AZT-DDC-Ritonavir** (**LEPORT C., 1996**)

❖ **En 2008**

- ✓ Coup d'envoi à Mexico de la conférence mondiale sur le SIDA ; l'ex-président américain **Bill Clinton** a appelé à pour suivre la bataille milliers de participants à la conférence (**LEPORT C., 1996 ; Cassuto JP., 1996**)
- ✓ **Le 30 juillet 2008**, le président américain **George W Bush** a promulgué une loi allouant 48 milliards de dollars à la prolongation de PEPFAR (Président Emergency Plan For Aids Relief, plan d'aide d'urgence du président contre le sida).

❖ **EN 2009**

- ✓ L'ONUSIDA met en place un programme pour l'élimination complète de transmission du VIH de la mère à l'enfant, jusqu'à **2015** (**World Health Organisation., 2015**).

❖ **EN 2011**

- ✓ Trente ans après la découverte de la maladie le magazine science a publié résultats d'une étude qui a démontré que le TARV chez des couples hétérosexuels sérodiscordants pouvait considérablement réduire les risques de transmission (**World Health Organisation., 2015**).

❖ **En 2012**

- ✓ Le premier test rapide à domicile pour le VIH ainsi que la prophylaxie pré-exposition par Truvada est approuvée par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux Food and drug administration (FDA) (**World Health Organisation., 2015**).

❖ **En 2015**

- ✓ L'essai clinique d'envergure START, conclut que l'initiation du traitement peu après le diagnostic de VIH réduit le risque de maladies graves et de mortalité, à cet effet, l'OMS a publié des lignes directrices mises à jour qui recommandent de traiter toutes les PV VIH, peu importe leur taux de CD4, les résultats de l'étude

PROUD menée en anglet terre confirment que la PrEP par Truvada est très efficace chez les HSH dans un contexte de « vrai vie » (**World Health Organisation., 2015**). Actuellement il y a progression de sida mais en moyen pourcentage.

2. Origine

Deux types de VIH (VIH-1 et VIH-2) infectent l'espèce humaine. L'origine de ces virus comme dérivants des virus d'immunodéficience simienne (SIV), contrepartie simienne des VIH, ne fait aucun doute (**Figure 1**) (**Hahn BH et al., 2000**), il y a une transmission inter-espèces du singe à l'homme.

Les auteurs ont émise, en 1990, hypothèse de l'origine simienne du VIH-1 selon eux, le VIH-1 proviendrait de certaines population de chimpanzés, cette possibilité était consolidée par l'organisation similaire des génomes des deux virus, le VIH-1 chez l'homme et le SIV chez les chimpanzés, L'origine simienne du VIH-1 a été suggéré par une autre étude, qui a mis en évidence chez des sujets camerounais des souches très proches du SIV présentes chez des chimpanzés vivant dans la même région qu'eux (**Hahn BH et al., 2000**).

Hahn et al. Quelques souches du VIH-2 sont presque identique à celles des SIV retrouvées dans la population des petites singes de l'Afrique de l'ouest (**Hahn BH et al., 2000**), nommés mangabeys, la coexistence d'épidémies chez l'homme et chez singe mangabey, a également été notée, dans certaines régions, en Afrique de l'ouest, la propagation du virus dans ces régions, a été expliqué par le phénomène de capture des singes qui ont été considérés comme animaux de compagnie.

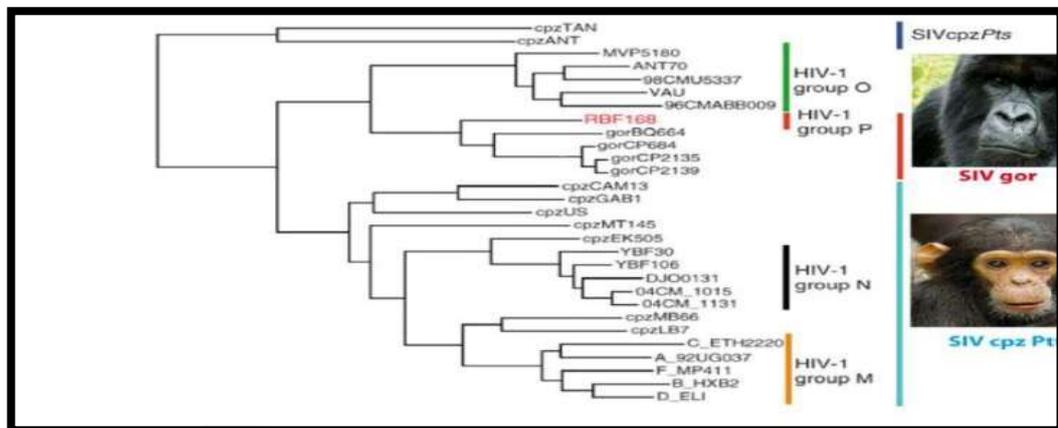


Figure 1. Arbre phylogénétique illustrant l'origine simienne du VIH-1 (**Mourez T et al., 2013**).

3. Définition du VIH

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est un rétrovirus de la famille des lentivirus responsables d'une infection chronique se traduisent par un déficit progressif des lymphocytes TCD4, la pathologie liée au VIH et à ce déficit immunitaire est le SIDA (Lekeehal N., 2017).

4. Définition du SIDA

Le syndrome immunodéficitaire acquise, plus connu sous son sigle de SIDA, n est pas une maladie au sens usuel de ce terme, c'est un syndrome polymorphe caractérisé par des infections répétées et rebelle, dites opportunistes car elle ne se développe et ne prennent leur gravité chez le malade que du fait d'un effondrement de son système immunitaire. (Fleury.,2002)

5. Caractères généraux

- ✓ Le VIH appartient à la famille des Rétroviridae qui se définissent selon par leur structure mais surtout selon par leur mode de réplication (Peeters M et al., 2008 ; Goff SP et al.,2013) .
- ✓ Leur matériel génétique qui est composées par de deux molécules d'acide ribonucléique (ARN) associées deux molécules d'un enzyme spécifique appelée réverse transcriptase (RT) ou transcriptase inverse (TI) (Peeters M et al., 2008 ; Goff SP et al.,2013).
- ✓ La réverse transcriptase (RT) qui permet la production un acide désoxyribonucléique (ADN) double brin complémentaire de LARN viral, dans la cellule infectée .L' ADN formé possède à chaque extrémité une même séquence répétitive de taille variable dite LTR (Long Terminal Repeat) qui lui permet de s'intégrer de manière stable dans L' ADN chromosomique de la cellule devenant un provirus (Gelderblom HR ., 1988) .
- ✓ Le provirus est considéré comme un gène de la cellule, il peut être soit (Mohammdi K., 2017)
 - ✚ Rester silencieux en se contentant d'être transmis aux cellules filles à chaque mitose.
 - ✚ Exprimer et être transcrit en ARN message (ARNm) et traduit en protéines virales, il y a formation d'une particule virale identiques au virus infection de départ.

✓ Le génome des rétrovirus possèdent trois gènes communs (Traore S., 1994 ; Katlama Cet *al.*, 2004)

- Les gènes gag ; gène de l'antigène de groupe.
- Les gènes Pol ; polymérase.
- Les gènes env ; enveloppe.

6. Classification et taxonomie

D'après l'international comittee on taxonomy of viruses (ICTC) , sept genres de rétrovirus (**Figure 2**) sont classés selon plusieurs critères tels que la pathogénicité , la structure du génome , la morphologie , les propriétés antigéniques parmi les quelles (**Katlama Cet al., 2004**) ;

- Les Alpha rétrovirus (ALV ; Avian Leukosis Virus).
- Les Beta retrovirus (MMTV; Mouse Mammary Tumor Virus).
- Les Gamma rétrovirus (MLV: Murine Leukemia Virus).

Des autres rétrovirus complexes codants en plus des protéines Gag, Pol, Env portant dans leur génome des séquences codantes pour des protéines régulatrices ;

- ✓ Delta rétrovirus (HLTV; Human Tlymphotropic Virus).
- ✓ Les Epsilon rétrovirus (WDSV : Walleye Dermal Sarcoma Virus).
- ✓ Les Spumavirus (HFV; Human Foamy Virus).
- ✓ Les Lentivirus (HIV: Human Immunodeficiency Virus) sont des virus responsables d'infection virales à développement lent.

Le VIH appartient à la sous – famille des Orthoretrovirinae et au genre des lentivirus (**Figure 2**), ces virus sont à l'origine de maladies opportunistes, dont l'évolution est spécifiquement longue et au cours des quelles répllication virale est constante, ils sont Également qualifiés de cytopathogène puisqu' ils induisent généralement la mort des cellules qu'ils infectent

- A l'intérieur de la nucléocapside du VIH-1 il ya des interactions entre le génome dimérique et la molécule NCP7 ainsi que le mode de dissociation entre les deux molécules d'ARN génomique restent mal connues et même la formation et des fonctions de la nucléocapside.
- Dans la nucléocapside il ya des enzymes exemple la transcriptase inverse, intégrase et la protéase ainsi que les molécules d'ARNt dont ARNt lys3 qui est l amorce répliquative du VIH-1 (Defranco AL ., 2009).

7-3. Enveloppe viral

L' enveloppe virale est limitée intérieurement par une membrane de 5-6 nm qui portent un rôle de facteur stabilisant la particule virale mature et qui servirait d'échafaudage supportant les projections de surface, voire de « pont » entre nucléocapside et glycoprotéines de l'enveloppe(Agut H et al .,1994).

7-4.Glycoprotéines

Les glycoprotéines (gp) d'enveloppe du VIH-1 appelées gp 120 (protéine externe) et gp 41(protéine transmembranaire) qui sont issues du clivage d'une protéine précurseur qui est un dimère (association de deux molécules) ; gp 160. Les glycoprotéines d'enveloppé du VIH-2 Dénommées gp 125 et gp 36 sont issus d'une autre protéine précurseur un dimère ; gp140 (Darlix JC et al., 1993).

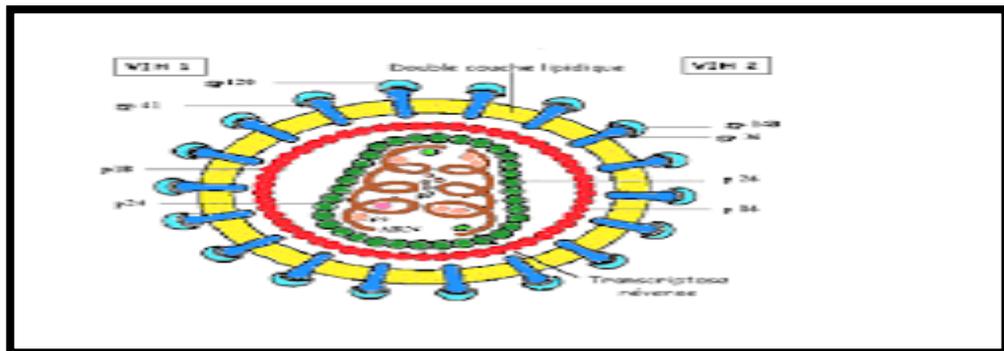


Figure 3. Structure du VIH-1 et VIH-2 (Suhasini M., 2009).

8. Structure du génome virale

Le génome des VIH compte plus de 9700 nucléotides encadrés aux extrémités 5' et 3' par des séquences LTR (Long Terminal Repeat). A l'intérieur de ce génome on distingue les dits classique (gag, Pol, env) et les gènes dit supplémentaires (tat, nef, vif, rev, vpr, vpu, vpx) (Figure 4)

8-1. Les gènes des classiques (structure)

8-1-1. Le gène gag ;

Code pour la production d'un précurseur gag (une poly protéine) de 55 kd clivée par une protéase virale (codé au niveau de l'extrémité 5' du gène Pol) en trois protéines (Seelamgari A *et al.*, 2004 ; Brun-Vézinet Fet *al.*, 2003)

- **.Constitutive du core** : la protéine majeure de poids moléculaire (PM) 24000 pour VIH-1 (P24/P25) et 26000 pour VIH-2 (P26).
- **Nucléoprotéine N terminale ou encore protéine de matrice** : protéine (17/18) pour VIH-1 et Protéine (16) pour VIH-2.
- **Protéine associée à l'ARN** : protéine 15 pour VIH-1, habituellement divisée en p7-p9 ces protéines jouent un rôle important dans l'encapsidation du génome dans la capsid virale et p 12 pour VIH-2.

8-1-2. Le gène Pol ;

Code pour donner d'un précurseur gag-Pol de 160Kd environ, ainsi que à partir ce précurseur permettre la synthèse des différents enzymes viraux sont dirigé de l'extrémité N terminale à l'extrémité C terminale (Seelamgari A *et al.*, 2004 ; Brun-Vézinet Fet *al.*, 2003)

- Protéase P10.
- La transcriptase inverse sous deux formes P66 et P51/53.
- Endonucléase (intégrase) P32 pour le VIH-1 et P 34 pour le VIH-2

8-1-3. Le gène env ;

Permettre de coder un précurseur appelé glycosylé de poids moléculaire de 160Kd (gp160), le glycosylé est clivé par un enzyme protéase cellulaire en deux glycoprotéines dans cytoplasme (Seelamgari A *et al.*, 2004 ; Brun-Vézinet Fet *al.*, 2003)

- **.La glycoprotéine externe** : (gp120 pour VIH-1 et gp 125 pour VIH -2) .
- **La glycoprotéine transmembranaire** : (gp41 pour VIH-1 et gp36 pour VIH-2)

8-2 . Les gènes des supplémentaires (régulation)

Ils codent pour les protéines de régulation. Les gènes tat, rev, nef, vif, sont communs au VIH-1 alors que le gène vpx se trouve chez le VIH-2 (Delfraissy J-F., 1999)

- **Le gène tat** : (Trans activateur) augmente l'excrétion des gènes viraux. Il est à l'origine de la protéine tat un activateur de réplication. Il est alcalisé dans le noyau.
- **Le gène rev** : (Régulation de l'expression du virus) exerce une fonction de régulation différentielle. Il code pour la protéine rev grâce à deux séquences nucléotidiques éloignées, chacune ayant un rôle distinct ; l'une étant inhibitrice, l'autre désinhibitrice.
- **Le gène nef** : (Negative regulatory factor) serait responsable de la latence du virus. Il code pour la protéine nef dont la séquence cible est située au début du génome viral dans les LTR. Cette séquence inhibe toutes les transcriptions
- **Le gène vif** : (virus infectivity factor) détermine le pouvoir infectant du virus il intervient dans la réplication virale. Il code pour la protéine vif qui augmente l'infectivité des virus. Les virus sans vif sont perturbés au niveau des dernières étapes de l'infection et infectent moins les cellules.
- **Le gène vpr** : (viral protein r) code pour une protéine incorporée dans le virion . Cette protéine agit avec la protéine p6 du gag et est localisée au niveau du noyau. Les fonctions de la protéine vpr sont : d'orienter les complexes de pré intégration vers le noyau, d'arrêter la croissance de cellules infectées la trans activation des gènes cellulaires et l'induction de la différenciation cellulaire.
- **Le gène vpu** : (viral protein u) retrouvé uniquement chez les VIH-1 et certaines vis. La protéine vpu est une protéine de type 1 a deux fonctions : dégradation du CD4 dans le Réticulum endoplasmique et augmentation du nombre de virus libérés des cellules infectées (réplication assemblage maturation) des virions.
- **Le gène vpx** : (viral protein x) retrouvé uniquement chez le VIH-2 son rôle exact du gène n'est pas encore bien élucidé.

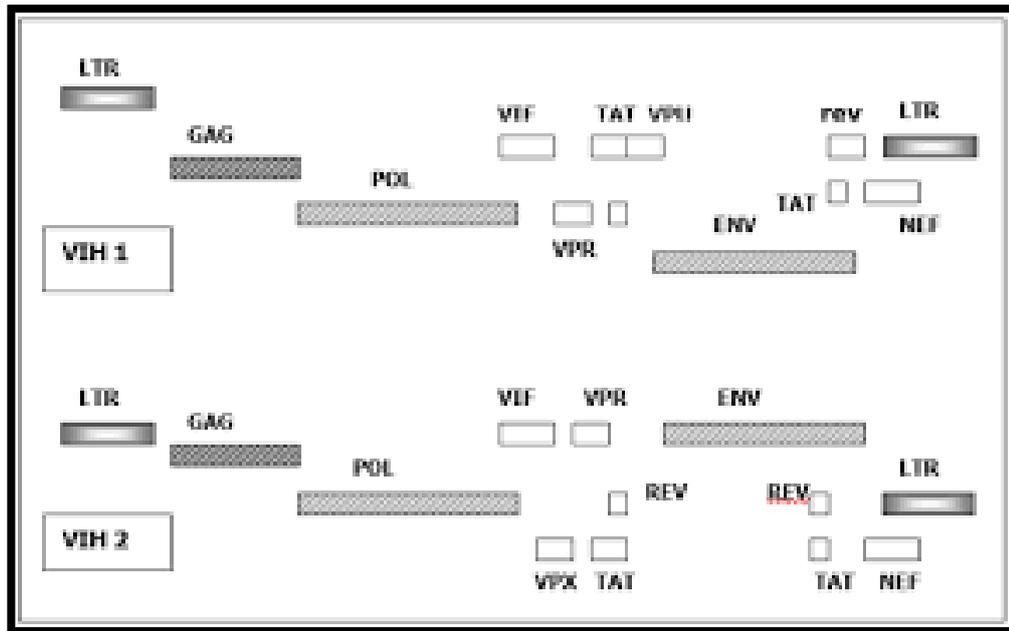


Figure 5. Organisation génétique du VIH-1 ET VIH-2(Sirany K ., 1993) .

9 .Cycle de multiplication

9 -1.Mécanisme d'entrée du virus dans les cellules

Grace à la protéine CD4, le virus du SIDA est capable de se fixer spécifiquement aux lymphocytes T4, qui portent cette protéine membranaire, cette fixation de gp 120, CD4 conditionne l'ensemble des étapes suivantes permettant la pénétration de la nucléocapside virale dans le lymphocyte (Lekeehal N., 2017).

La fixation du gp 120, la protéine CD4 permet de masquer une autre protéine membranaire virale : gp41 celle -ci s'insère alors dans la membrane du lymphocyte, permettant la fusion des deux membranes, et ainsi l'entrée du matériel virale dans la cellule. (Lekeehal N., 2017).

9-2. Cycle de réplication

Le processus de réplication du VIH se fait en différentes étapes (Figure 6) (Gisselqist D et al .,2002 ; Montagnier L.,19978) :

L'influence des cellules cibles commence par l'**attachement du VIH** à leur surface .Cet attachement se fait par l'intermédiaire des glycoprotéines de l'enveloppe du virus et leurs récepteurs spécifiques (molécules CD4) associés à d'autres corécepteurs (molécules CCR5 et CXCR4, récepteurs de chémokines), situés sur les cellules cibles. Cette étape est suivie de la **pénétration de l'ARN viral** dans le cytoplasme de la cellule après fusion entre

membrane cellulaire et enveloppe virale .Une fois à l'intérieur, l'ARN est transformée en ADN proviral à partir des nucléosides triphosphates de la cellule hôte. Cette étape appelée **transcriptase inverse** est catalysée par l'ADN polymérase en ARN dépendante ou transcriptase reverse ou inverse caractéristique des rétrovirus .L'ADN proviral intégré est transcrit en protéines, parmi celles –ci les protéines de la nucléocapside de la matrice et les enzymes de réplication (reverse transcriptase, protéase, intégrase) sont synthétisées sous forme d'un seul polypeptide qui dérive d'un gène polycistronique du VIH. La séparation de ce polypeptide est nécessaire à la constitution de nouvelles particules virales infectieuses. Cette séparation qui a valeur de maturation est assurée par la protéase virale qui procède **clivage séquentiel** du polypeptide.

Les protéines et d'autres ARN messagers **sont assemblées** pour former de nouveaux virions .Ceux-ci sont **libérés par bourgeonnement** à travers la membrane cellulaire .Le cycle dure 48 heures et le virus se multipliant activement génère des milliers de particules virales prêtes à infecter de nouvelles cellules.

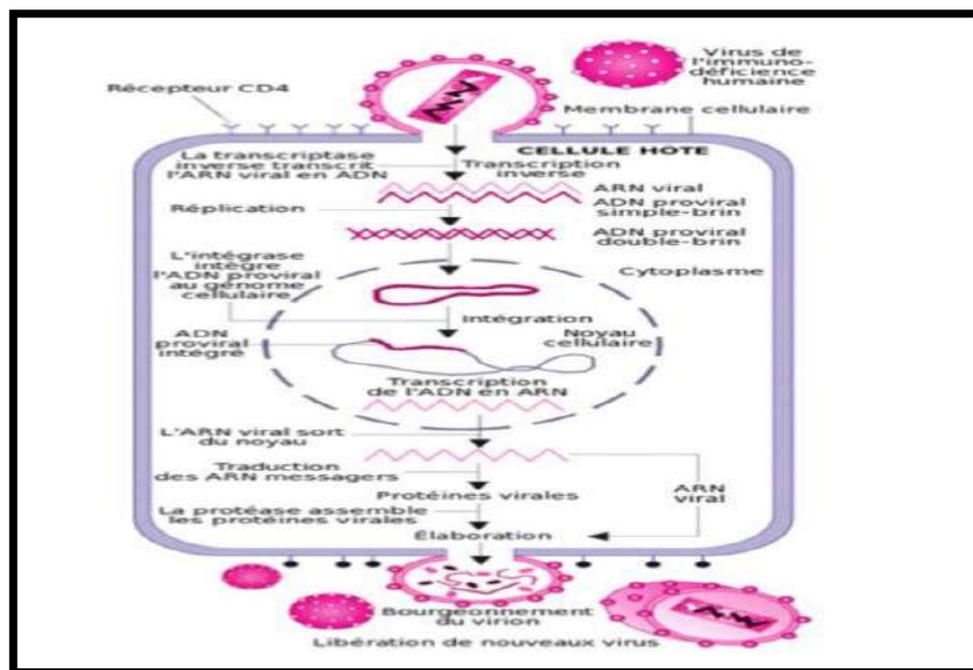


Figure 7. Cycle de réplication du virus l'immunodéficience humaine.

Source:([www. Google image](http://www.google.com) 25/11/2009)

10. Propriétés biologiques du VIH

Elles sont nombreuses dont (Lekeehal N, 2017) ;

- ✓ La présence d'une transcriptase inverse.
- ✓ La capacité de l'ADN viral à s'intégrer dans le génome de la cellule hôte.
- ✓ L'infection préférentielle des lymphocytes T du phénotype (axillaire) ; helper

11. Propriétés physico-chimiques du VIH

C'est un virus fragile qui meurt quelques minutes seulement en dehors du sang de l'organisme, il est tué par (Ernest D et al., 2004 ; Lekeehal N., 2017) :

- La chaleur (55°C) en 30 minutes.
- L'alcool éthylique à 70° en 20 minutes.
- L'eau de javel à 1/10° en 20 minutes.
- La glutaldéhyde à 0,10 % en 10 minutes.
- Le chlorure benzalkonique
- Le cytéol dilué au 1 /10° en 30 secondes in vitro

12. virulence

- Les virus à tropisme macrophagique, appelés également virus à tropisme M ou virus R5, utilisent le corécepteur CCR5, ce sont des isolats peu cytopathogène, n'entraînant in vitro que peu de syncytiums ces isolats sont rencontrés le plus souvent chez les patients au stade de primo-infection et chez les patients asymptomatiques (Mohammdi K., 2017) .
- Les virus à tropisme lymphocytaire, appelés également virus à tropisme T ou virus X4 (décrits au paravent comme des virus SI ; syncytium inducing), utilisent le corécepteur CXCR4, ce sont des isolats très cytopathogène (Brun-Vézinet F et al., 2003)
- Les caractéristiques des VIH-1 obtenus à partir d'études in vitro pour comprendre la virulence pourraient ne pas être in vivo, le virus VIH-2 semble avoir une pathogénicité moindre que celle du VIH-1, la nature des déterminants viraux responsables de cette moindre virulence n'est pas encore connue (Mohammdi K, 2017)

13. La variabilité génétique

Le VIH est un virus qui a une très importante variabilité génétique et présente ainsi une très grande diversité, deux types ont été découverts ;

- ♣ VIH-1 , le plus présent dans le monde.
- ♣ VIH-2, moins contagieux que VIH-1 il sévit principalement en Afrique de l'ouest, il comprend le VIH-2A et le VIH-2B.

13-1.VIH-1

Au sein de chaque type existent plusieurs groupes (**Figure 8**) (**Brun-Vézinet Fet al ., 1999**) qui, à leur tour, comportent des sous – types.

Depuis 1998, le VIH-1 est classé en trois groupes au quel s'ajoute un quatrième découvert en 2009 (**Plantier JC et al . ,2009**)

- ✓ Groupe M (pour major group)
- ✓ Groupe O (pour out lier group)
- ✓ Groupe N (pour non-M, non-O group)
- ✓ Groupe P

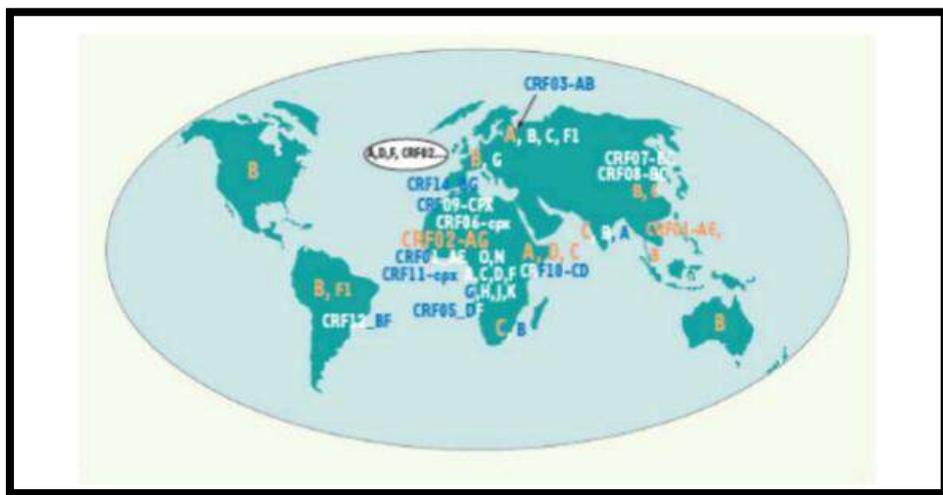


Figure 9. Carte représentant la distribution géographique de sous du VIH-1(**Plantier JC et al . ,2009**)

13-2.VIH-2

Le VIH-2 présente un potentiel évolutif plus lent que le VIH-1, ce virus différée par son génome et ses caractéristiques phylogénique, il est génétiquement très proche du virus de

l'immunodéficience simienne (**figure7**) il est moins répandu que le VIH-1 (**Romieu I et al ., 1990**) et se localise surtout en Afrique de l'ouest, il est classé en 8 groupes (A à H) et seuls les groupes A et B sont épidémiques.

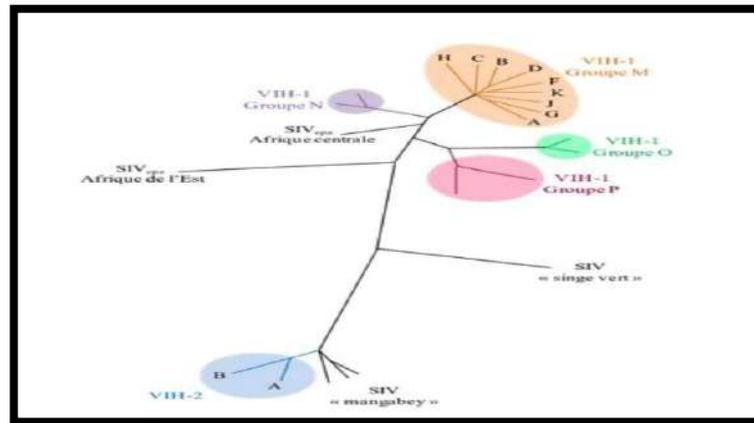


Figure 10. Diversité génétique du VIH sont représentés les 4 groupes du VIH-1 (M ,N,O ,P) les 9 sous types du groupe M(A,B,C,D,E,F,G,H,I,J,K) , les relation phylogénétiques avec le SIV de différent ainsi que celles avec le VIH-2 et de ses 8 sous types majoritaire (**Plantier JC et al.,2009**)

14. Les cellules cibles

Les cellules cible du VIH sont la cellule qui possèdent la molécule CD4 à leur surface. Les CD4 sont exprimées en forte quantité à la surface des lymphocytes T auxiliaires et à un degré moindre sur les cellules présentatrices d'antigènes : monocytes, macrophages et cellules dendritique. La molécule CD4 fonctionne comme un récepteur de haute affinité pour la gp120 du VIH. Des récepteurs accessoires tels que CCR5 et CXCR4 sont nécessaires à la pénétration du virus dans la cellule hôte (**Emini EA et al ., 2004**).

D'autres cellules peuvent être infectées comme, cellules de langerhans, des cellules micro gliales dans le cerveau (**Lekeehal N, 2017**).

15. La réponse immunitaire anti VIH

Comme tous les autres pathogènes, l'organisme déclenche une réponse immunitaire contre le VIH pour tenter de l'éliminer. Les deux types de la réponse immunitaire sont, la réponse innée (ou naturelle) qui est immédiate avec les cellules dendritiques et cellules naturelles tueuses (NK), et la réponse adaptative(ou acquise) qui est tardive et qui s'effectue avec les lymphocytes TCD8+ conjointement avec les LT CD4+ et la réponse humorale.

15-1. Les éléments du système immunitaire

(Sirany K, 1993)

- ✓ Les macrophages
- ✓ Les lymphocytes T et B, les lymphocytes B produisent des anticorps après avoir été différenciés plasmocytes, les lymphocytes T sont :
 - Sont auxiliaires ou T helper (T4)
 - Sont suppresseurs (T et B)
 - Sont cytotoxiques (CTL)
 - Sont cellules tueuses naturelle (NK)
- ✓ Polynucléaires
- ✓ Les monocytes

15-2. La réponse innée

La réponse immunitaire innée est une réponse non spécifique, qui se met en place rapidement (quelque minutes à quelques heures suivent la pénétration du pathogène dans l'organisme), il se fait par l'activation des macrophages, les cellules dendritiques et les cellules tueuses naturelles (NK). Son rôle est de fournir une réponse rapide face aux agents pathogènes afin de donner le temps nécessaire au système immunitaire adaptatif de développer une réponse spécifique. La réponse innée ne possède pas de mémoire immunitaire (**Youssefi F., 2019**).

Lors de l'infection aiguë par le VIH, les macrophages et les cellules dendritiques vont être les premiers à reconnaître le VIH. Ils le font par des motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP) grâce à leurs TOLL like récepteurs (TLR) (**Shey MS et al., 2016**). Les cellules dendritiques détectent le virus et sont les premières à libérer des cytokines pro-inflammatoires antivirales telles que l'interféron- γ (INF- γ) et le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α). De plus elle augmente l'expression de CCR7 pour diriger les cellules vers les ganglions lymphatiques. Néanmoins aussi comme conséquence d'accroître le niveau d'activation du système immunitaire augmentant ainsi le nombre de LT CD4+ susceptibles d'être infectés.

Les cellules NK font partie de la première ligne de défense contre les agents pathogènes. Les cellules NK interagissent avec le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I

(CMH- 1) exprimé sur les cellules infectées, et sécrètent des cytokines immunorégulantes tel que le facteur de nécrose tumorale β (TNF- β), le facteur de croissance hématopoïétique (GM-CSF) et les interleukine (IL)-10 (Shey MS et al., 2016) et IL-13, des chimiokines ainsi que d'autres molécules antivirales, telle que les granzymes (Martin MP et al., 2007). Ce mécanisme induit la destruction des cellules infectées et permet de restreindre la réplication virale.

15-3. Réponse adaptative

Pendant que le système immunitaire inné travaille, le système immunitaire adaptatif bâtit sa réponse (elle se met en place au bout de 4 jours environ). La première réponse du système immunitaire adaptatif provient des cellules T CD8+. Les cellules LT CD8+ apparaissent très tôt dans l'infection et sont l'origine du déclin du pic viral pendant la phase aiguë de l'infection. Les lymphocytes T CD8+ sont activés par la reconnaissance d'un peptide du VIH présent par le CMH de classe I (Figure 11), situé sur les cellules infectées, ainsi que par les cytokines (INF- γ et IL-2) produites par les cellules TCD4+ (Deeks SG et al., 2007). Lorsque les cellules T CD8+ sont activées, elles sécrètent aussi des chimiokines (RANTES, MIP-1 α et MIP-1 β) et des α -défensines qui empêchent l'entrée du virus dans de nouvelles cellules (Yang OO et al., 1997) les protéines perforines et granzymes A et B afin de lyser les cellules infectées et induire leur apoptose (Champagne Pet et al., 2001) L'immunité humorale passera par l'activation de lymphocytes B sécrèteur d'anticorps, elle est dirigée essentiellement contre env, seule protéine virale exprimée à la surface des cellules infectées et des virions (Figure 12).

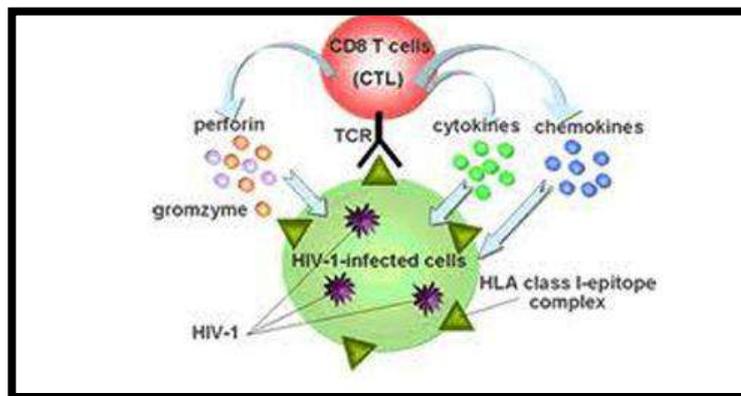


Figure 13. Activation de TCD8+ après la reconnaissance d'un peptide du VIH par CMH I (Youssoufi F., 2019).

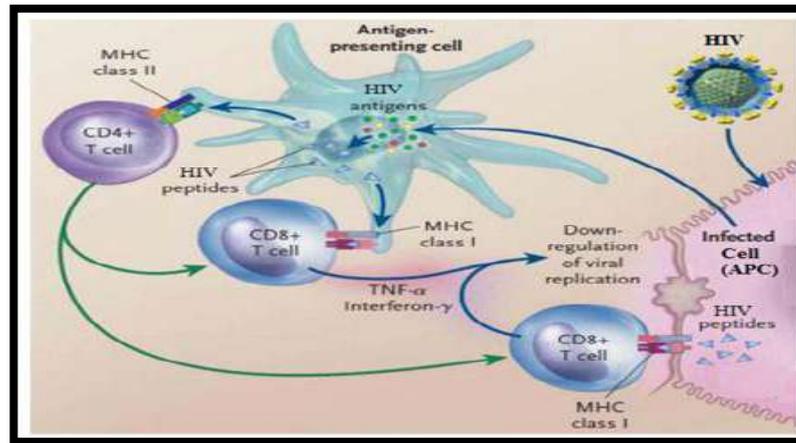


Figure 14. La réponse lymphocytaire contre le VIH. (Youssofi F., 2019).

Lors de la phase aiguë, ces cellules contrôlent l'infection, mais deviennent inefficaces lors de l'apparition de virus mutants émergents (Goonetilleke N et al., 2009) Les cellules spécifiques au VIH perdent beaucoup de leur efficacité, parce qu'elles ne sont plus aptes de reconnaître leur épitope. Le corps doit donc générer de nouvelles cellules T CD8+ (Douek DC et al., 2003) cependant, avec la baisse du nombre de cellules T CD4+, le processus n'est pas aussi facile. Malgré tout, ce sont ces réponses qui vont permettre de contrôler la réplication du VIH et de retarder la progression de la maladie (Luong Sabado R et al., 2009) La réponse à l'infection par le VIH et la progression à la maladie a une cinétique différente entre les patients.

16. Physiopathologie du VIH

16-1. Les voies de transmission du VIH

16-1-1. Transmission par voie sexuelle

La transmission par voie sexuelle au travers des sécrétions génitales lors de rapport sexuels non protégés représente la voie majeure de contamination, le virus a la possibilité de passer d'un individu à un autre au cours d'un rapport par sa présence dans le liquide séminal, le sperme et les sécrétions cervico-vaginales du sujet infecté, la transmission hétérosexuelle est majoritaire sur l'ensemble de la population sexuellement contaminée (Marine M., 1994).

16-1-2. Transmission par voie sanguine

La transmission du VIH par voie sanguine (et autres liquides biologiques contenant du sang) est la deuxième voie de transmission du virus, le risque de contracter le VIH suite à une exposition sanguine s'élève à 0,3 %, il concerne principalement (Marine M., 1994)

- Les usagers de drogues intraveineuses à travers les échanges de seringue au moment des injections.
- Les hémophiles et les transfusés ne sont plus aujourd'hui exposés du fait des mesures de quarantaine, sécurisation des produits dérivés du sang.
- Les sujets à risque d'exposition en milieu professionnel ; les professionnels de santé en milieu de soins et en laboratoires qui sont victimes d'accident (AES) .

16-1-3. Transmission mère – enfant

La transmission d'une mère porteuse à son enfant est stabilisée entre 1 et 2 % si la mère bénéficie d'un traitement préventif et entre 15 à 20 % dans le cas contraire (**Marine M, 1994**).

16-2. Histoire naturelle de l'infection par VIH

Dans l'histoire naturelle de l'infection par le VIH, l'évolution de la maladie en l'absence de traitement peut se décomposer en trois phases ; la contamination suivie de la primo-infection, la phase asymptomatique et le stade SIDA (**figure 10**), (**Youssoufi F., 2019**).

16-2-1. La primo-infection (phase séroconversion)

Cette première phase va durer de 3 à 8 semaines en fonction des individus, la charge virale augmente rapidement au cours des premières semaines suivant la contagion (**figure 10**), cette phase se caractérise par l'apparition fréquente de symptômes similaires d'une grippe ; fièvre, éruptions cutanées, fatigue, maux de tête, etc.

Les premiers signes de la maladie disparaissent spontanément après quelques semaines à l'augmentation du nombre de lymphocytes TCD8+ et d'anticorps anti-VIH dans le sang, l'apparition de ces anticorps anti-VIH environ 3 semaines après la contamination permet le dépistage de l'infection (séroconversion), actuellement d'autres méthodes plus fines permettent un diagnostic plus précoce, comme le dosage de l'antigène p24 produit par le virus. (**Youssoufi F., 2019**).

16-2-2. La phase asymptomatique (ou phase de latence clinique 7 à 10 ans)

Correspond à la mise en place d'un équilibre entre les défenses immunitaires de l'hôte et la réplication du virus, cela conduit à une réduction de la charge virale dans le sang et peut permettre un contrôle apparent du VIH jusqu'à plusieurs années suivant l'infection (**figure 13**), le renouvellement rapide de nouvelles particules de VIH circulantes résulte de réplication

constante du virus in vivo dans les tissus lymphoïdes, cela pour conséquence l'augmentation régulières de la charge virale observée au cours de l'évolution de l'infection ,et donc la mort progressive des lymphocytes TCD4+ se régénérant jusqu' épuisement du thymus (Fauci A ., 1996).

16-2-3.Le stade SIDA (phase symptomatique)

Dans les 10 ans qui suivent l'infection par le VIH , on observe une augmentation de la charges virale suivie par la chute du nombre lymphocytes CD4+ ($< 200 /\text{mm}^3$) , elle se définit par des manifestations symptomatiques (diarrhée chronique , amaigrissement , fièvre ,,) apparaissent alors des infection multiples dites opportunistes , des cancers et encéphalites (figure 11) .

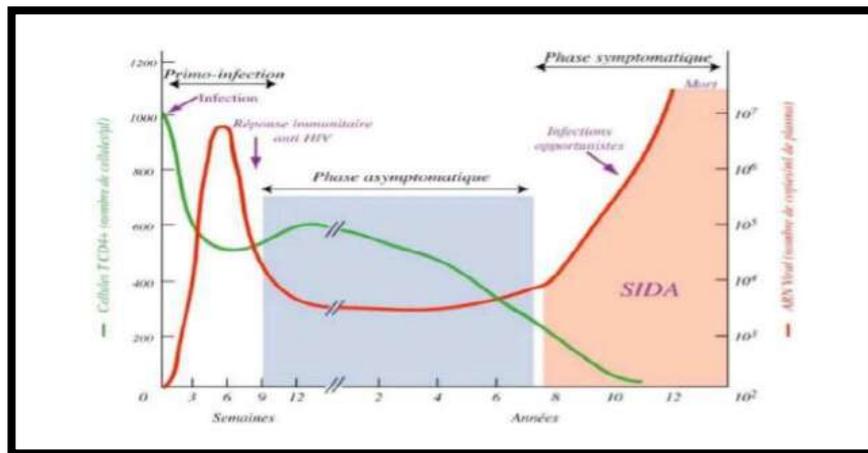


Figure 15. Phases de l'évolution de l'infection à VIH, en absence de traitement (Youssef F ., 2019). .

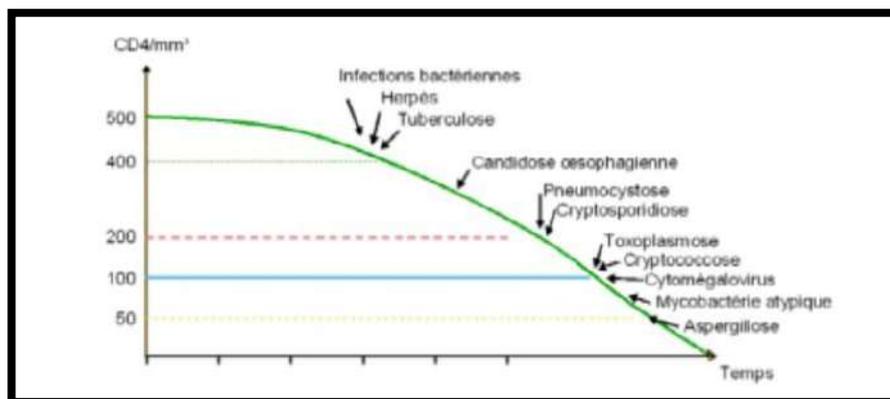


Figure 16. Survenue des infections opportunistes en fonction du nombre de lymphocytes TCD4. (Girad PM et al., 1996)

17. Traitement antirétroviral

Le traitement ARV relève actuellement de 4 classes médicamenteuses chacune pouvant contenir plusieurs molécules (**tableau1**) soit un panier de 12 molécules (adultes et enfants) . Quatre classes sont d'utilisation courante. Il s'agit des molécules ARV de la classe des (**Guide national de prise en charge thérapeutiques de l'infection VIH /SIDA et des infection opportunités de l'adulte et de l'enfant ., 2021**) :

- Inhibiteur nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI).
- Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI).
- Inhibiteurs de protéase (IP).
- Inhibiteurs d'intégrase (INI).

Deux classes n'ont, à ce jour, jamais été introduites car d'indication limitée. Il s'agit des molécules ARV de classe des :

- Inhibiteurs de fusion.
- Inhibiteurs d'entre.

Tableau 1.molécules par classes d'ARV actuellement disponibles (2017 et 2021) (**Guide national de prise en charge thérapeutiques de l'infection VIH /SIDA et des infection opportunités de l'adulte et de l'enfant ., 2021**)

INT	INNTI	IP	INI
Zidovudine(AZT) 1987	Nevirapine (NVP) 1996	Ritonavir* (RTV) 1996	Raltégavir * (RAL) 2007
Lamivudine (3TC) 1995	Efavirenz (EFV) 1998	Lopinavir /Ritonavir (LPV /r) 2000	
Abacavir (ABC) 1998		Atazanavir (ATV) 2003	
Ténofovir Disoproxil Fumarate (TDF) 2001		Darunavir (DRV) 2006	

Emtricitabine (FTC)*2003			
-------------------------------------	--	--	--

18. Prévention

En absence de vaccin efficace contre le VIH, des stratégies préventives collectives et individuelles sont nécessaires pour réduire le risque de contamination (**Peeters M ., 1999**) :

- ✓ prévention de la transmission sexuelle :
 - Abstinence permanente.
 - Fidélité mutuelle constante de deux personnes séronégatives du VIH.
 - Préservatif masculin ou féminin.
- ✓ Prévention de transmission mère-enfant :
 - Dépistage prénuptial du VIH.
 - Traitement ARV précoce de toute femme enceinte séropositive (accouchement en fonction de la charge virale).
 - ARV du nouveau -né issu d'une mère séropositive.
 - Allaitement artificiel absolu d'enfants nés de mère séropositive au VIH.
- ✓ Prévention de la transmission sanguine
 - Dépistage systématique chez les donneurs de sang.
 - Prévention de la transmission aux personnels médicaux et paramédicaux. reposant sur les mesures hygiènes classique.
 - Utilisation de matériels à usage unique.

Chapitre II :

Epidémiologie de l'infection à VIH

1. Epidémiologie

1-1.Epidémiologie dans le monde

Selon les dernières estimation de l'ONUSIDA /OMS, plus de 40 millions de personnes provenant en majorité de l'Afrique subsaharienne, vivaient avec le VIH /SIDA , ce pendant, la situation de la pandémie mondiale du VIH revête de grandes entre les différent régions du monde (**Harries AD et al., 2016**) (**figure11**) .concernant les dynamiques actuelles des épidémies et les progrès accomplis dans la lutte contre le VIH. Néanmoins un point reste toutefois commun à tous les pays qui sont le retard du dépistage et de la prise en charge de l'infection au VIH. Le dernier rapport de l'ONUSIDA de l'année **2017** sur la pandémie du VIH a fournis les statistiques suivantes :

- 20 ,9 millions de personnes avaient accès au traitement 2017 ;
- 36,7 millions (30,8 millions – 42 ,9 millions) de personne dans le monde vivent avec le VIH en 2016 ;
- 1,8 millions (1,6millions – 2,1 millions) de personne ont été nouvelle infectée au VIH en 2016 ;
- 1 millions (830 000- 1 ,2 millions) de personnes sont mort de maladies liées au sida en 2016 ;
- 76,1 millions (65,2 millions – 88,0 millions) de personne ont infectées au VIH de puis le début de l'épidémie ;
- 35 ,0 millions (28,9 millions – 41,5 millions) de personne sont aux suites de maladies liées au sida depuis le début de l'épidémie ;
- 34,5 millions (28,8 millions –40,2 millions) d'adultes dont 17,8 millions (15 ,4 millions – 20 ,3 millions) de femme (de plus de 15 ans) Les estimations générales de l'infection, VIH selon les régions de l'OMS sont représenté par la figure suivante :

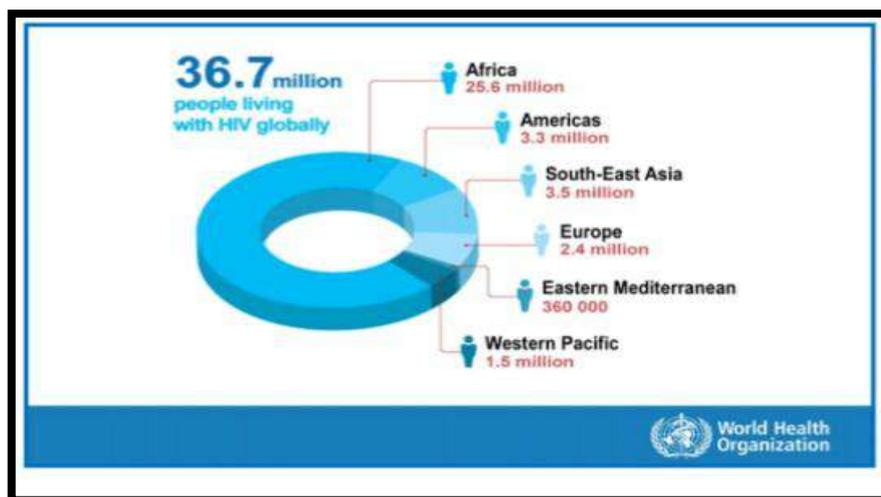


Figure11. Les estimations générales de l'infection VIH selon les régions d'OMS) (Christine Rouzioux ML., 2003)

Depuis 2010, les nouvelles infections au VIH chez les adultes ont diminué d'environ 11%, passant de 1,9 million (1,9 -2,1 millions) à 1,7 millions (1,4 millions de 1,9 millions), ce chiffre reste à peu près stable puisque on compte dans le monde entier, 1,8 millions (1,6-2,1 millions) de personnes qui ont été nouvellement infectées au VIH chez les enfants, les nouvelles infections au VIH ont aussi diminué de 47%, depuis 2010, de 300 000 (230 000 – 370 000) en 2010 à 160 000 (100 000 – 220 000) en 2016 (Figure12).

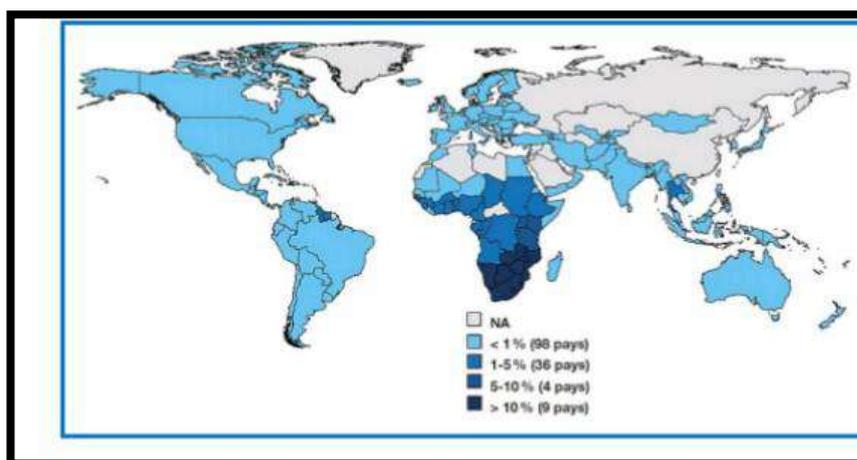


Figure12. Nombre de personnes nouvellement infectées au VIH (Lanerrie J., 2017)

En parallèle on a observé une baisse de la mortalité liée au VIH de 48% depuis le niveau le plus élevé de 2005, en 2016, 1 millions de personnes (830 000-1,2 millions) sont mortes de suites des maladies liées au sida dans le monde, versus 1,9 millions (1,7-2,2 millions) en 2010 et 1,5 millions (1,3 -1,7 millions) en 2010 (Lanerrie J., 2017)

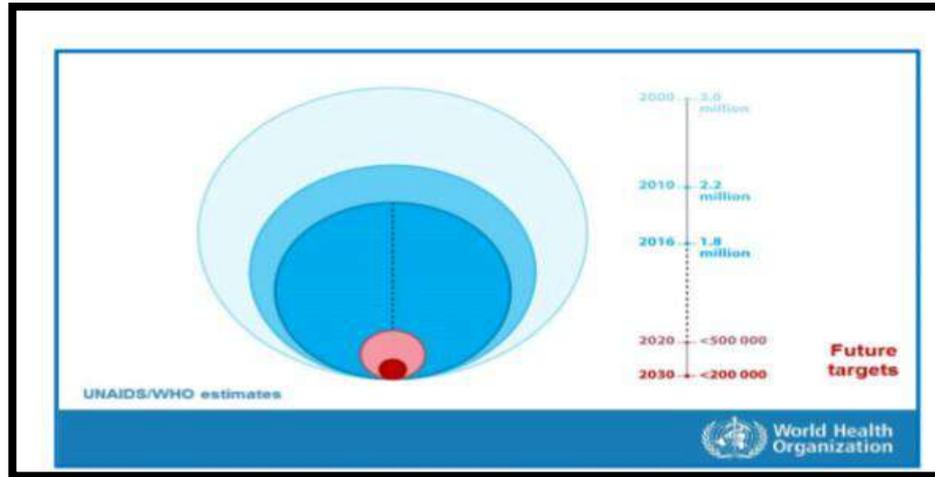


Figure13. Prévalence l'infection VIH dans le monde (Lanerrie J., 2017)

1-2.Epidémiologie du MENA

Cet MENA a porté sur plus de 5000 sources de données. En plus d'un grand nombre de publications non publiées, de rapports nationaux, d'études d'ONG, de rapports d'organisations internationales, de rapports d'EDS et autres

Plus précisément, il y avait 1036 publications liées à la propagation infectieuse du VIH dans ses différents modes de transmission, 1393 liées au comportement sexuel et aux niveaux de comportement à risque.

1-2-1.Groupes à haut risques

Il existe de nombreuses données sur la prévalence du VIH et les comportements à risque parmi les UDI, les HSH et TSH de la région MENA.

1-2-1-1.Les consommateurs de drogues injectables et le VIH

La consommation de drogues injectables est un mode de transmission clé du VIH dans le monde entier et s'est avérée être le mode de transmission dominant dans plusieurs pays de la région MENA comme l'Iran et la Libye. Le VIH a été documenté parmi les UDI dans la majorité des rapports de surveillance de la notification des cas des pays de la région MENA (Collumbien M et al., 2009)

Dans l'ensemble, la prévalence du VIH parmi les UDI se situait dans la fourchette basse à intermédiaire par rapport aux chiffres mondiaux avec des variations significatives entre les pays de la région MENA et à l'intérieur de ceux-ci. On parle d'épidémies concentrées lorsque la prévalence du VIH dépasse régulièrement 5% dans un groupe à haut risque, tout en restant inférieure à 1 % chez les femmes enceintes. L'incidence du VIH s'est avérée très

élevée (16,8 % par personne –année) chez les UDI dans un centre de détection en Iran. des taux de prévalence élevés ont également été documentés parmi les UDI en Libye (jusqu' à 59,4%), à Oman (jusqu' 27%) et au Bahreïn (jusqu' à 21,1%) a prévalence de consommation de drogues injectables dans la région (**Collumbien M et al ., 2009**) .

1-2-1-2.Les HSH et le VIH

L'orientation sexuelle, l'identité sexuelle, l'attrance pour le même sexe et le comportement sexuel entre homme sont des concepts qui ne sont souvent pas clairement définis ou distingués dans les données collectées sous le vaste thème des HSH

La transmission du VIH entre HSH a été rapportée dans la plupart des pays de la région MENA (**Elrashied S et al ., 2006**) .Les résultats des enquêtes de prévalence ponctuelle disponibles parmi les HSH, y compris les MSW.

Les niveaux de prévalence suggèrent une transmission considérable du VIH parmi les MSM dans la région MENA. Les taux de VIH rapportés parmi les MSM varient de 0 % dans certains groupes à 9,8 % au Soudan et 27,6 % au Pakistan (**Khan OA et al ., 1998**) .

Les MSM étudiés dans la région MENA ont montré un large éventail de comportements à haut risque tels que des partenariats sexuels multiples de différents types. Plus de 90% des populations de MSM ont des nombres indifférents de m allant de 2 à 42 partenaires par an . Le taux d'utilisation du préservatif était également Relativement faible, le manque de disponibilité étant l'une des limites signalées dans plusieurs contextes. Au contraire, le travail sexuel masculin s'est avéré être prévalent parmi les HSH de la région MENA qui l'utilisent probablement pour subvenir à leurs besoins dans un environnement de stigmatisation et de réseau de soutien pauvre . Le travail sexuel commercial a été rapporté par 20% en Égypte (**El-sayed N et al ., 2002**) , 36% au Liban et 67% et 75,5% (**Elrashied S ., 2005**) au Soudan.

1-2-1-3.Les travailleuses du sexe et le VIH

les données disponibles indiquent que le commerce du sexe est assez répandu dans toute la région MENA, avec des taux variant entre 0,1 et 1% des femmes adultes (**Vandepitte J et al ., 2006**) .Ces estimations se situent plutôt dans la partie basse de la fourchette mondiale , mais sont cohérentes avec la prévalence du travail sexuel chez les femmes en Indonésie et en Malaisie, deux nations à prédominance musulmane, qui est respectivement de 0,4 % et 0,9 % . Pourtant, dans la région MENA, la scie des réseaux sexuels hétérosexuels commerciaux est sensiblement plus grande que celle des réseaux à risque des UDI et des HSH, ce qui implique une épidémie de VIH potentiellement plus

importante si le VIH s'établit fermement dans les réseaux sexuels commerciaux. La pression sociale et économique, les perturbations familiales et les conflits politiques sont les principaux moteurs du commerce sexuel dans cette région (**Lau JT et al ., 2002**) .

1-3.Épidémiologie de VIH en Algérie :

Depuis la notification obligatoire en 1990 des cas des sida et de séropositivité VIH, l'état épidémiologique du VIH a toujours été celui d'une épidémie de type peu active, avec une Prévalence dans la population générale faible inférieure à 0.1% mais concentrée dans les groupes de population exposée au risque VIH notamment les professionnelles de sexe (PS), hommes ayant des relations sexuelles avec d'autres hommes (HSH) et les usagers de drogues injectables (**Plan national stratégiques de lute contre les IST VIH SIDA., 2020-2024**)

. Selon les données du rapport national de la riposte au Sida en Algérie de l'année 2018, à partir des estimations du logiciel de l'ONUSIDA EPP-Spectrum (**Figure 174**) :

- Le nombre estimé de PVVIH (adultes et enfants) est de l'ordre de 16000 personnes dont 7000 femmes et près de 500 enfants de moins de 15 ans : Cependant, selon le rapport du Laboratoire National de Référence (LNR), au 30 septembre 2019 et depuis le début de l'épidémie, un total cumulé de 13000 (dont 1930 au stade SIDA) a été recensé avec pour principal stéréotype le VIH1 à plus de 99%.
- Le principal mode de transmission observé est le mode hétérosexuel soit é titre occasionnel (48.5%) ou dans la cadre de l'hétérosexualité stable (23.5%), soit à travers la profession de sexe (27.4%), suivi du mode homosexuel chez l'homme (9.3%).
- La transmission est devenue essentiellement autochtone et aucun région du pays n'a été épargnée, sachant que les taux de notifications les plus élevés sont observés dans les régions Ouest et Centre.

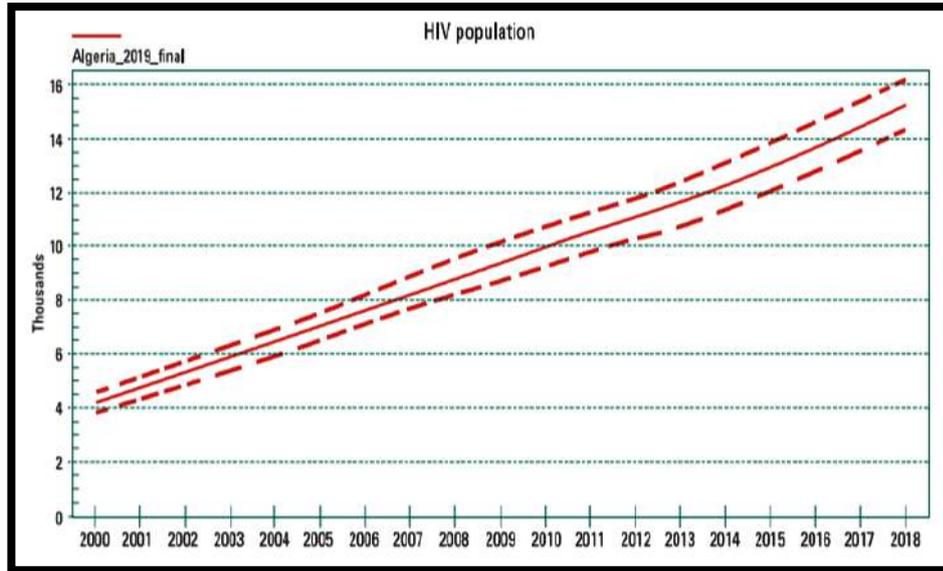


Figure 184. Evolution du nombre estimé de PVVIH en Algérie 2000-2018

Source :(Estimation Spectrum ONUSIDA ., 2018)

- Le nombre estimé d'adultes de plus de 15 ans nouvellement infectés : Une évolution stationnaire au cours de ces cas deux dernière année : au cours de ces dernières années, bien qu'on ait observé une tendance à la baisse des taux d'incidence du VIH chez les deux genres passant de 0.028 p. 1000 (2015) à 0.017 p. 1000 (2018) chez l'homme et de 0.011 à 0.008 p. 1000 chez la femme entre les deux années (Figure24), le nombre estimé de nouvelles infections à VIH a connu une augmentation progressive passant de 600 cas en 2000, à 900 cas en 2010 pour rester stationnaire autour de 1000 nouveaux cas par an entre 2017 et 2018 (Figure15) .

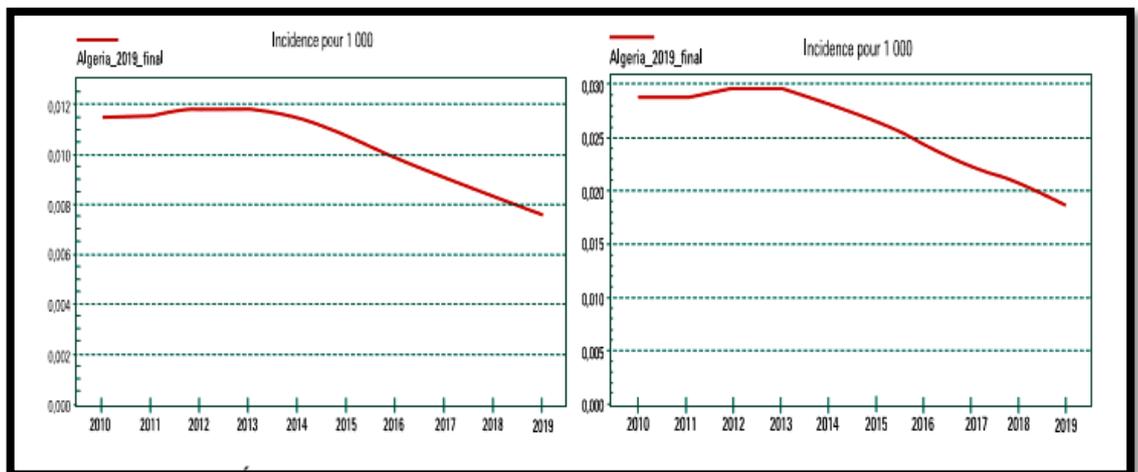


Figure 15. Evolution du taux d'incidence estimé du VIH chez les 2 genres Algérie 2000-2018

Source : (Estimation Spectrum ONUSIDA ., 2018)

1-3-1.Selon les données du LNR

La même tendance est observée à partir de l'analyse des données, où les données rapportées à la population de référence, objectivent une évolution stationnaire du taux d'incidence brute et des taux spécifiques par genre de 2010 à 2017, oscillant entre 1,5 et 1,9 p. 100000 chez le genre féminin et 1,5 et 2 p.100000 chez le genre opposé (**Plan national stratégiques de lutte contre les IST VIH SIDA., 2020-2024**) (**Figure16**).

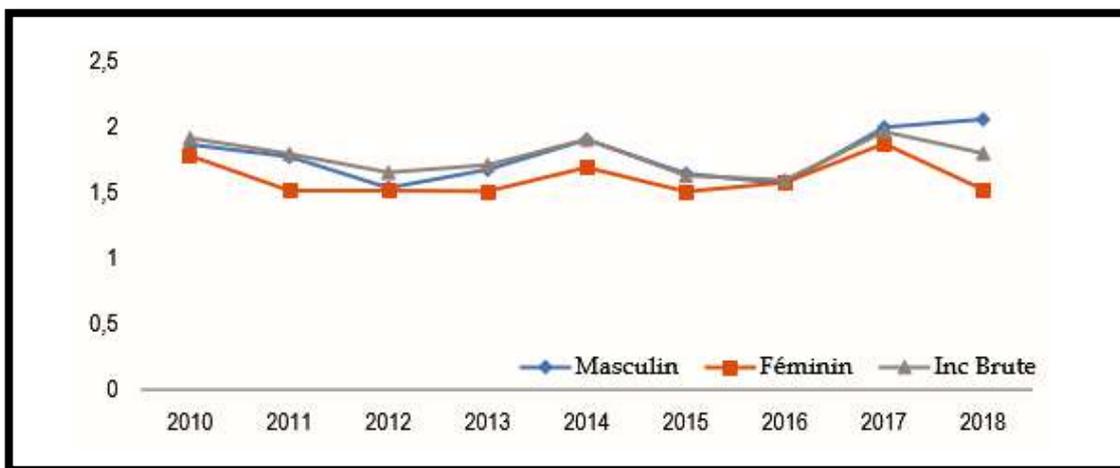


Figure 16. Evolution des taux d'incidence p. 100000 du VIH en Algérie chez les 2 genres de 2010 à 2019 (**Source LNR**)

Mais, le nombre de nouvelles infections diagnostiquées a augmenté de plus de deux fois entre 2010 et 2019, passant 4867 cas à 11070 cas, alors que celui des cas de sida maladie a connu une évolution relativement stationnaire passant de 1170 en 2010 à 1930 en 2019 (**Figure17**).

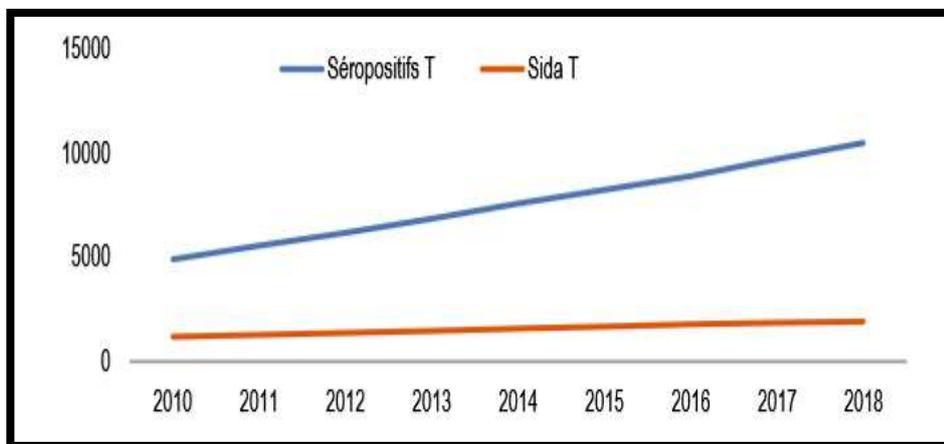


Figure 17. Evolution des cas cumulés de séropositifs et de sida en Algérie de 2010 à 2019 (**Source LNR**)

Les estimations par âge montrent que l'épidémie du VIH touche toutes les tranches d'âge de 15 à 59 ans avec une prédilection entre 20 et 54 ans. Le nombre de nouvelles infections diagnostiquées chez les enfants 0-4 ans est en augmentation à partir de 2010, ce qui conforte l'hypothèse d'une amélioration du diagnostic chez le nouveau-né et le nourrisson, **(Figure35)**.

Ces données sont confortées par celles du LNR qui montrent une incidence spécifique par âge plus élevée chez les 20-54 ans avec un léger pic chez les 0-4 ans (6,1 p.100000). par ordre de fréquence décroissance, les taux d'incidence les plus élevés sont observés dans les tranches d'âge 30-34 ans (29.9 p.100000 cas), 35-39 ans (25.9 p.100000 cas), 40-44 ans(24.3 p. 100000 cas) et 20-29 (21.9 cas p. 100000). Les jeunes de 20 à 24 ans enregistrement un taux de 11.9 cas p. 100000 **(Figure18)**.

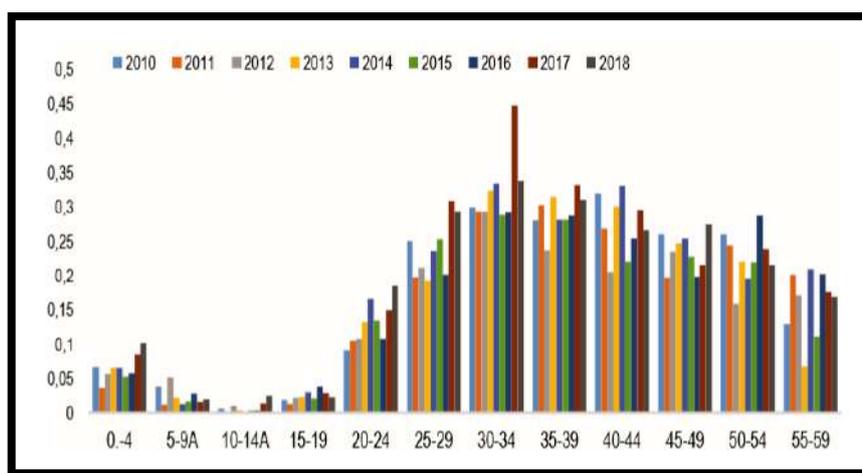


Figure 18. Evolution des taux d'incidence spécifique par âge du VIH en Algérie de 2010-2018 (Source LNR)

1-3-2.Situation de l'épidémie au sein des populations clés

Plus 9/10 des nouvelles infections sont souvenues chez les populations clés, en 2018, dans la région MENA.

Compte tenu du caractère concentré de l'épidémie dans le pays, les populations clés jouent un rôle important dans la dynamique de la transmission de l'infection VIH **(Plan national stratégiques de lutte contre les IST VIH SIDA., 2020-2024)**

. Elles constituent, de ce fait, un véritable enjeu pour la riposte et rendent compte de l'importance d'une bonne connaissance de l'évolution de leur séroprévalence et de leur cartographie. La séroprévalence de l'infection VIH au sein des populations clés est illustrée dans le tableau.

Tableau 2.Séroprévalence de l'infection VIH chez les populations clés en 2019

Source : MSPRH Etude sur l'estimation de la taille chez les populations clés (PS, HSH et CDI) – 2019

	Nombre de cas testés	Nombre de cas VIH+	Séroprévalence
PS	416	30	7.21%
HSH	405	09	2.22%
CDI	270	05	2.2%

1-3-3.Situation de l'épidémie a VIH au sein des populations en contexte de vulnérabilité

Pour cette catégorie de population en contexte de vulnérabilité représentée par les jeunes, les femmes, les hommes en uniforme, les détenus et les populations mobiles (nomades, migrants, routiers) tels que définis par le précédent PNS, seules les données concernant les populations mobiles essentiellement les migrants se sont avérées disponibles. Ceci pose avec acuité tout les problèmes de la disponibilité de l'information dans la mise en œuvre du PNS.

Aussi, pour cette population de migrants (**Plan national stratégiques de lutte contre les IST VIH SIDA., 2020-2024**)

- Concernant leur situation épidémiologique: L'étude IBBS 2019 chez les migrants a mis en évidence au taux de prévalence du VIH de 2.2% chez l'ensemble de la population enquêtée avec un caractère chez les femmes (5.83%) vs (1.24%) chez les hommes.
- Concernant leur taille : selon les données du Ministère de l'intérieur, des collectivités l'Aménagement du territoire, 3500 migrants , issus de 24 pays africains , sont enregistrés , par semaine , aux frontières du sud Algérien , soit un flux annuel de 168 000 arrivés .Les estimations faites par l'OIM sur la base d'une étude sur la cartographie des migrants réalisée au 1 trimestre 2019 , ont donné un nombre de 19740 migrants implantés dans 3wilaya ciblées . Ces migrants étaient originaires de plus de 20 pays de nationalités différentes de la région subsaharienne.

1-4.Epidémiologie de VIH dans la Wilaya d'OUARGLA

Les tableaux suivants représentent des statistiques des cas de l'infection à VIH de la Wilaya d'OUARGLA en 2020 (bilant d'activités des centre de référence de prise en charge de l'infection a VIH/SIDA ., 2020):

- Les décès au SIDA en 2020 :

Nombre de patient décèdes en 2020 :

- ✓ Aucun enregistré ment chez sexe (masculin /féminin) dans un âgé < 5 ans et tranche d'âges 5 - 14 ans
- ✓ Nombre des décès chez d'âgée >15 ans (masculin 3/ féminin 2)

Tableau3.Représentation des décès au sida en 2020 (bilant d'activités des centre de référence de prise en charge de l'infection a VIH/SIDA ., 2020)

Nombre de patient décèdes en 2020	< 5 ans	5 - 14 ans	>15 ans	Total
Masculin	0	0	3	3
Féminin	0	0	2	2
Totale	0	0	5	5

- Femme séropositif âges de 30-49 ans frotté cervico-vaginal en 2020 :
Nombre de femme vivant avec le VIH de tranche d'âge 30-49 ans sont 42
- Professionnelles du sexe (PS) séropositif au VIH en 2020 :
 - ✓ Aucun enregistré ment chez âges < 25 ans
 - ✓ Nombre de professionnelles du sexe séropositif au VIH chez > 25 ans est 8

Tableau4.Représentation de Nombre de professionnelles du sexe séropositif au VIH en 2020 (bilant d'activités des centre de référence de prise en charge de l'infection a VIH/SIDA ., 2020)

Nombre de professionnelles du sexe séropositif au VIH	< 25	> 25	total
	0	8	8

- Homme ayant des relations sexuelles avec des hommes (HSH) séropositif en 2020 :
 - ✓ Aucun enregistré ment chez âges < 25 ans
 - ✓ Nombres d'homme ayant des relations sexuelles avec des hommes séropositif du VIH chez > 25 ans est 8

Tableau5.Représentation de Nombres d'homme ayant des relations sexuelles avec des hommes séropositif du VIH en 2020 (bilant d'activités des centre de référence de prise en charge de l'infection a VIH/SIDA ., 2020)

Nombres d'homme ayant des relations sexuelles avec des hommes séropositif du VIH	< 25	> 25	total
	0	8	8

- Consommateurs de drogues injectables séropositives du VIH en 2020 :
 - ✓ Nombre d'usagers de drogues injectables séropositifs au VIH de sexe masculin chez d'âgée < 25ans est 1 mais chez d'âgée > 25 ans est 3
 - ✓ Nombre d'usagers de drogues injectables séropositifs au VIH de sexe féminin chez d'âgée < 25ans est 0 mais chez d'âgée > 25 ans est 0

Tableau6.Représentation de Nombre d'usagers de drogues injectables séropositifs au VIH en 2020 (bilant d'activités des centre de référence de prise en charge de l'infection a VIH/SIDA ., 2020)

Nombre d'usagers de drogues injectables séropositifs au VIH	< 25	> 25	total
masculin	1	3	4
féminin	0	0	0
Total	1	3	4

- Détenus séropositif au VIH 2020 :
 - ✓ Nombre de détenus séropositifs au VIH de sexe masculin chez d'âgée < 25 ans est 0 1 mais chez d'âgée > 25 ans est 1
 - ✓ Nombre de détenus séropositifs au VIH de sexe masculin chez d'âgée < 25 ans est 0 1mais chez d'âgée > 25 ans est 0

Tableau7.Représentation de Nombre de détenus séropositifs au VIH en 2020 (bilant d'activités des centre de référence de prise en charge de l'infection a VIH/SIDA ., 2020)

Nombre de détenus séropositifs au VIH	< 25	> 25	total
Masculin	0	1	1
Féminin	0	0	0
Total	0	1	1

Chapitre III :

ELISA ET VIH

1. Définition d'ELISA

Le technique ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) est principalement utilisée en immunologie afin de détecter et/ou doser la présence des protéines, d'anticorps ou d'antigènes dans un échantillon. Ce test sérologique détectent notamment les anticorps produits par l'organisme en la réponse immunitaire (**Janlou CH., 2013**).

2. Découverte de test ELISA (Evolution des immuns essais jusqu'à l'invention d'ELISA

▪ Théorie de la chaîne latérale

En 1987, Paul Ehrlich, médecin et scientifique allemand, a publié une communication visant à expliquer comment les cellules interagissent avec leur environnement, à une époque où l'on savait peu de choses sur la nature et la constitution des organismes vivants (**Ehrlich P et al ., 1987**) Sa théorie suppose que les cellules possèdent des "chaînes latérales" qui se lient à des éléments nutritifs, nécessaire pour les maintenir en vie. Cette théorie, connue plus tard sous le nom de "théorie de chaîne latérale", a permis d'expliquer l'interaction spécifique entre les AC et les AG dans le sang (**Witebsky E et al .,1954 ; Taylor MW et al .,2014**). Ehrlich a théorisé que les AC produits par les globules blancs agissent comme des chaînes latérales sur la membrane cellulaire. Selon lui, les chaînes latérales peuvent se lier aux corps étrangers par le biais de structure chimique scientifique qu'elles possèdent sur leur cotés des liaisons. Il a ensuite nommé ces structures chimiques "récepteurs". **Ehrlich** a proposé que les phénomènes de liaison entre le récepteur et un agent infectieux était comme l'ajustement parfait entre une serrure et une clé (**Ehrlich P., 2010**). Il a également émis l'hypothèse que les cellules sous la menace de micro-organismes étrangers développement des chaînes latérales supplémentaires pour capturer les éléments de la toxine. Ces chaînes supplémentaires, conçues pour se détacher dans le flow sanguin circulant, ont été identifiées comme des anticorps. Ce sont ces AC qu'**Ehrlich** a définis pour la première fois comme des "balles magiques"; des entités biomoléculaires qui ciblent spécifiquement un type de toxine ou de pathogène, et aucun autre, sans nuire à l'organisme (**Chuaire Let al., 2008 ; Ehrlich P., 2010**)

Paul Ehrlich considéré comme le père de l'immunologie moderne, a été le premier à proposer un modèle de molécule d'AC, une structure ramifiée composée de multiples sites de liaison pour capturer des agents étrangers (AG) (**Davies DR .,1993**), Ce modèle correspondait à la théorie de la "serrure et de la clé" pour les enzymes, initialement proposée par Emil Fischer (**Fischer E.,1894**)

- **Théorie de liaison antigène –anticorps**

Depuis l'avènement de la théorie de la chaîne latérale, les opinions opposées de **Paul Ehrlich et de Jules Bordet** ont remis en question la nature de cette réaction. **Ehrlich** pensait que la réaction était purement chimique, tandis que **Bordet** affirmait qu'il s'agissait d'une adsorption physique se produisant d'un composant sur l'autre. La théorie de **Bordet** suggérait que la réaction de liaison était de type chimie des colloïdes, qui s'appuie sur les caractéristiques de la surface plutôt que sur la nature chimique des réactifs. **Bordet**, ainsi que d'autres scientifiques dont Suvante **Arrhennuis et Thorval Madsen**, ont par la suite décrit la réaction comme un modèle de neutralisation acide-base réversible. **Karl Landsteiner**, biologiste, médecin et immunologiste autrichien, a suite trouvé des preuves suggérant que la spécificité antigénique dépendait fortement des contours de la charge de l'AG, prouvant ainsi que la réaction dépendait à la fois des caractéristiques physiques de la surface et de la nature chimique de la l'AG. **En 1934, John R. Marrack** a rassemblé les connaissances existantes dans ce domaine dans son célèbre ouvrage "The Chemistry Of Antigens and Antibodies" (**Marrack JR., 1934**).

Marrack a suggéré que les anticorps ont plus d'un site de liaison et que, par conséquent, l'AG et l'AC forment un réseau (**Marrack JR ., 1934**). **Marrack** a continué à travailler sur la réaction AG-AC et a publié un certain nombre d'articles de recherche important, des revues, ainsi que la deuxième édition de son livre " The Chemistry Of Antigens and Antibodies" (**Marrack JR ., 1942 ; Marrack Jet al., 1938**). Les idées de **Marrack**, concernant la chimie des protéines ont évolué au fil du temps. Néanmoins, ses découvertes relatives à la réaction AC-AG, qui sont arrivées au bon moment dans l'histoire des immuns essais, sont toujours valable même dizaines des années après la publication de son livre.

- **Découverte de la structure des anticorps**

En 1948, l'immunologiste suédoise **Astrid Fagraeus** a découvert que les cellules B du plasma étaient directement impliquées dans la production d'AC (**Fagraeus A ., 1948**). Prés d'une décennie plus tard, **en 1957**, un scientifique **australien, Frank MacFarlane Burnet**, a développé les idées de **David Tamlage**, un immunologiste américain, et a introduit a la "théorie de la sélection clonale"(**Hodgkin PD et al ., 2007 ; Edelman GM., 1959**) . Cette théorie décrit que lorsqu'un AG pénètre dans la circulation sanguine ou les fluides tissulaires, il fixe à la surface des lymphocytes avec des sites réactifs correspondant à ses déterminants antigénique (**Hodgkin PD et al ., 2007 ; Jordan MA et al ., 2008**).

La théorie de la sélection clonale a jeté les bases pour que d'autres scientifiques fassent avancer ce domaine. En **1959**, **Gerald Edelman et Rodney Porter** ont rapporté indépendamment leurs trouvés sur la structure moléculaire de l'AC (**Pauling L., 1940 ; Porter R., 1959**). En **1972**, le prix Nobel de physiologie ou de médecine a été attribué conjointement à Edelman et Porter "pour leurs découvertes concernant la structure chimiques des anticorps" [19]. La première structure d'un fragment d'AC avec une résolution atomique a été présentée à la communauté scientifique en **1973** (**Inbar D et al., 1972**) , Cette découverte a été suivie d'un autre grand bond en avant, lorsque **George Köhler et César Milstein** ont réussi, en **1975**, à produire des AC monoclonaux par subculture continue de cellules fusionnées (**Köhler G et al., 1975**) , ce qui a marqué l'ère moderne de la recherche et de la découverte des anticorps.

- **Invention du dosage radio-immunologique**

Le dosage radio-immunologique (RIA) a été introduit pour la première fois par des scientifiques américains, **Solomon Berson et Rosalyn Yalow**, en **1960** pour la mesure du plasma endogène (**Yalow RS et al., 1996**) . Le prix de Nobel de physiologie ou médecine **1977** a ensuite été attribué à Yalow pour "le développement de la RIA pour les hormones peptidiques"[23]. Berson, cependant n'avait pas partagé le prix avec Yalow en raison de sa mort soudaine en 1972. Les techniques d'immunodosage marquées par la radioactivité ont rapidement attiré l'attention des chercheurs et des cliniciens, au cours de la décennie suivante, des essais immunologiques aléatoires pour de nouveaux analytes ont été signalés. En **1968**, **Miles et Hales** ont mis au point une "immuno-radio-métrie" dans laquelle les AC étaient marqués par des agents radiologiques au lieu de l'AG pour mesurer l'insuline dans la plasma humaine (**Lequin RM.,2005 ; Miles L et al.,1968**) Au cours des premières étapes de l'utilisation de RIA en tant qu'essai immunologique largement appliqué, l'iode 131 a été utilisé comme marqueur car il n'existait pas d'autres solutions à l'époque. Les risques sanitaires éventuels liés à l'utilisation de matériaux radioactifs ont été quelque peu réduits lorsque l'iode 125 (rayonnement faible) a été introduit sur le marché. Cependant, les questions de santé pour le personnel de laboratoire et les déchets radioactifs sont restées des préoccupations majeures.

- **Invention de test immunologique enzymatique ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)**

En **1966 et 1969**, ont rapporté le succès du couplage AG-AC en utilisant des enzymes telles que la phosphatase alcaline et la glucose oxydase entre autres (**Avrameas S et al., 1966 ;**

Avrameas S.,1969). Le dosage immunologique enzymatique (EIA) a été mis au point dans les laboratoires de recherche Organon aux Pays-Bas par **Anton Schuurs et Bauke Van Weemen**. Le test immuno-enzymatique (ELISA) a été conçu à l'université de Stockholm, en Suède par **Peter Perlman et Eva Engvall en 1971**. **Perlman et Engval** ainsi que Schuurs et Van Weemen ont reçu le prix scientifique allemand "Biochemische Analytik" **en 1976** pour cette invention (**Lequin RM.,2005**).

La nouvelle méthode a été utilisée pour la première fois pour déterminer les taux d'IgG dans le sérum de lapin. La même année les scientifiques ont réussi à quantifier la gonadotrophine chorionique humaine dans l'urine en utilisant la peroxydase de raifort. Depuis lors, la méthode ELISA a été utilisée dans de nombreuses applications différentes et est devenue une méthode de recherche et de diagnostic de routine en laboratoire dans le monde entier (**Ehrlich P., 2010**).

La première méthodologie ELISA impliquait des molécules rapporteuses chromogènes et des substrats pour générer un changement de couleur observable qui surveille la présence de l'AG. Les progrès ultérieurs de la technique ELISA ont conduit au développement de rapporteurs fluorogènes, de PCR quantitative et d'électrochimiluminescence pour générer des signaux. Cependant, certains de ces techniques ne reposent pas sur l'utilisation de substrats liés à des enzymes mais sur des rapporteurs non enzymatiques qui utilisent le principe de l'ELISA (**Chuaire Let al., 2008 ; Fischer E.,1894**)

Le dernier développement, **en 2012**, a été un ELISA ultrasensible à base enzymatique qui manipule des nanoparticules comme reporters chromogènes. Cette technique peut générer un signal de couleur visible à l'œil nu, avec une couleur bleue pour les résultats positifs et une couleur rouge pour les résultats négatifs. Cependant, cette méthode est qualitative et ne peut déterminer que la présence ou l'absence d'un analyte et non sa concentration (**Davies DR et al., 1993**).

3. Evolution du test ELISA.

Les tests ELISA utilisent des réactions immuno-enzymatiques en phase solide, la réaction antigène-anticorps est révélée par une coloration obtenue par l'action d'une enzyme sur son substrat. Ils sont utilisés en raison de leur capacité à analyser un grand nombre d'échantillons en particulier dans les centres de contrôle du sang.

Les tests ELISA peuvent être classés en fonction de plusieurs critères ; l'antigène, le mode de révélation de l'anticorps, le type d'anticorps recherché (**Adiko E ,2013**) .

3-1.En fonction de l'antigène

Depuis 1985, les tests immuno-enzymatiques (TIE) ont fait des progrès considérables, atteignant aujourd'hui, le stade de 4^{ème} générations (**Tableau 8**) (**Adiko E ,2013**) .

- **Tests de 1^{ère} génération** : Ils ont utilisé comme antigène des lysats de VIH purifiés, obtenus à partir de lignées cellulaires infectées, leur sensibilité ainsi que leur spécificité étaient faibles ils ne sont plus utilisés de nos jours.
- **Tests de 2^{ème} génération** : Ils utilisent comme antigène des protéines recombinantes obtenus par génie génétique et /ou des peptides synthétiques du VIH, la spécificité des tests s'était affinée mais ils ne détectaient que les anticorps de type **IgG**.
- **Tests de 3^{ème} génération** : Ils utilisent les même antigènes que les tests de 2^{ème} génération mais ils permettent de détecter les anticorps de type **IgG et IgM**, réduisant ainsi la fenêtre sérologique.
- **Tests de 4^{ème} génération** : Ils permettent détecter simultanément l'antigène **p24** et les anticorps anti-VIH en utilisant pour ce dernier le même principe que les tests de 3^{ème} génération, cette double détection permet de réduire encore plus la fenêtre sérologique et de faire un dépistage précoce des cas d'infection.

Tableau 8.Caractéristiques des différentes générations des tests ELISA anti VIH (**Peng J et al .,2014**) .

Test de dépistage VIH				
	1 re G	2 ^{ème} G	3 ^{ème} G	4 ^{ème} G
Antigens utilisée	Lyse virale	Protéines recombinantes et peptides	Protéines recombinantes et peptides	Protéines recombinantes et peptides
ELISA	Indirect	Indirect	Sandwich	Indirect
Détection antigène P24 Ig anti-VIH	IgG	IgG	IgG et IgM	IgG et antigène
Sensibilité	+	++	+++	++++
Spécificité	+	++	+++	+++
Année d'apparition	1985	1987	1989	1997

3-2. En fonction du mode de révélation de l'anticorps

(Adiko E ., 2013)

- **ELISA indirect** : Le sérum ou le plasma du sujet est ajouté à une phase solide contenant l'antigène et le tout est incubé à une température donnée, pendant une période indiquée par le fabricant du kit, la révélation se fait par une anti-globuline humaine marquée et l'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle au taux d'anticorps présents.
- **ELISA par compétition** : Ces tests sont basés sur la différence d'affinité entre les anticorps anti-VIH du patient et les anticorps anti-VIH marqués par une enzyme, les anticorps du sérum inhibent la liaison des anticorps anti-VIH marqués, à la phase solides, si la concentration.

D'anticorps du sérum est élevée, très peu anticorps marqués pourront se lier à l'antigène, ainsi l'intensité de la coloration sera inversement proportionnelle au taux d'anticorps présents dans le sérum.

- **ELISA sandwich** : Cette méthode ne diffère de ELISA par compétition que par étape finale, la révélation de la réaction se fait par l'addition d'anticorps anti-VIH conjugués se fixant sur les sites anticorps restés libres, la présence anticorps dirigés contre le VIH se traduit par une colorations très intense, les tests ELISA sandwich sont plus sensibles que les tests ELISA indirects et conservent une bonne spécificité.

3-3.En fonction du type d'anticorps recherché

- **Les tests mono spécifiques** : Ils permettent la détection d'un seul stéréotype du VIH c'est -à -dire qu'ils détectent soit les anticorps anti-VIH-1 soit les anticorps anti- VIH-2.
- **Les tests mixtes** : Ils détectent simultanément les deux types d'anticorps (anti-VIH1 et anti-VIH2) y compris ceux dirigés contre le sous type O, cependant, ils ne peuvent pas indiquer stéréotype retrouvé chez le patient.
- **Les tests discriminants** : Ils sont capables de détecter les deux stéréotypes de manière distincte ils permettent donc un stéréotypages de l'infection.

3. Principe générale

La technique ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) est une technique immuno-enzymatique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps

grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps (**Magnies F., 2008**)

4 .Principes de la technique ELISA pour les maladies infectieuses

- ✓ L'utilisation d'anticorps pour le diagnostic des maladies infectieuses représente une méthode spécifique et rapide. La technique ELISA est. une technique immuno-enzymatique (**Magnies F., 2008**)
- ✓ La réaction colorée permet de confirmer l'identification la présence du virus recherché et l'intensité de la couleur donne une indication de la quantité d'antigènes ou d'anticorps dans l'échantillon donné (**Magnies F., 2008**).

5. Les différents types d'ELISA

La technique actuellement la plus utilisée pour la recherche des anticorps anti-VIH est une technique immuno enzymatique : ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) , c'est une méthode simple , destinée au dépistage de sérums , dans cette réaction l'antigène viral ou anticorps sont fixé par absorption physique à un support solide (microplaque ou bille de polystyrène) on distingue quatre grands groupes de technique .

5-1.Techniques d'ELISA direct

La détection ELISA directe est beaucoup plus rapide que les autres techniques ELISA. Le test est également moins sujet aux erreurs car moins de réactifs et d'étapes sont nécessaires. Dans ce test il n'y a pas d'AC secondaires susceptibles de réagir de manière croisée. Toutefois, cette méthode présente certains inconvénients. L'immobilisation de l'AG n'est pas spécifique, un bruit de fond plus élevé peut être observé par rapport à la méthode indirecte. Ceci est principalement dû au fait que toutes les protéines de l'échantillon, y compris la protéine cible, se lient à la plaque. ELISA direct est moins flexible car un AC primaire conjugué spécifique est nécessaire pour chaque protéine cible. Comme aucun AC secondaire n'est utilisé, il n'y a pas d'amplification du signal, ce qui réduit la sensibilité du test. Enfin, la technique ELISA direct est généralement utilisée lorsque la réponse immunitaire à un AG doit être analysée. Les étapes de test sont illustrées dans la (**figure 19**) (**Peng J et al .,2014**) .

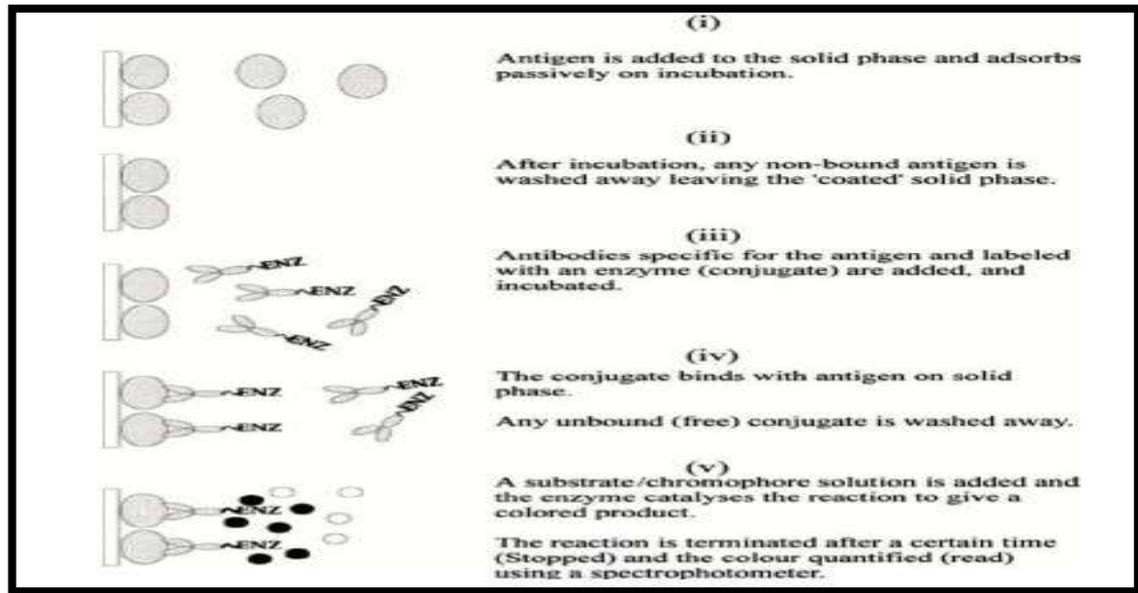


Figure19.. Différents étapes de test ELISA direct

(Source: The ELISA Guide book)

5-2. Technique d'ELISA indirecte

Principe

Le sérum à étudier est mis d'abord à incuber en présence du support sensibilisé : microplaque ou bille, des complexés anticorps se forment et leur présence est révélée dans un Second temps, par l'adjonction d'un sérum anti globuline humaine marqué par une enzyme , après une phase de lavage minutieux , le substrat de cet enzyme donnera une réaction colorée d'autant plus intense que le sérum est riche en anticorps , des témoin positifs et négatifs inclus dans chaque réaction permettent de déterminer la valeur seuil ou limite , les sérums dont la densité optique lue au spectrophotomètre est supérieure à cette valeur sont considérés comme positifs. (Engavall et perlman ,1971)

Les étapes

Ce test permet de détecter ou doser des anticorps, il se réalise en 4étapes (Figure20) (Engavall et perlman ,1971)

✓ Les premières étapes appelée « coating » de l'antigène :

Elle consiste à incuber dans des puits , la solution d'antigène spécifique de l'anticorps recherché, la fixation l'antigène sur le fond des puits se fait électrostatiquement, les plaques sont incubées à 4 °C pendant une nuit, les puits sont ensuite lavés pour éliminer les antigènes en excès avec du tampon de lavage

✓ **La deuxième étape consiste à fixer l'anticorps à doser**

On incube à 37°C dans les puits, la solution d'anticorps à doser pendant environ 30 minutes à 2 heures, les anticorps se fixent spécifiquement sur l'antigène, les puits sont ensuite lavés pour éliminer les anticorps à doser en excès avec du tampon de lavage.

✓ **La troisième étape consiste à fixer anticorps de détection**

On incube à 37 °C dans les puits, la solution d'anticorps de détection pendant environ 30minutes à 2 heures, les anticorps de détection se fixent spécifiquement sur les anticorps à doser, les puits sont lavés pour éliminer les anticorps de détection en excès avec tampon de lavage, notons que les anticorps de détection sont couplés à une enzyme qui en présence de son substrat le transforme en produit de réaction détectable et mesurable grâce à l'apparition d'une coloration.

✓ **La quatrième étape consiste à révéler les anticorps fixés**

On incube à température ambiante et à l'obscurité pendant 10minutes, une solution révélatrice contenant le substrat pour l'enzyme, l'apparition d'une coloration dans le substrat indique la présence de l'anticorps à doser l'intensité de celle-ci est proportionnelle à la quantité d'enzyme présent et donc à la concentration d'anticorps recherché.

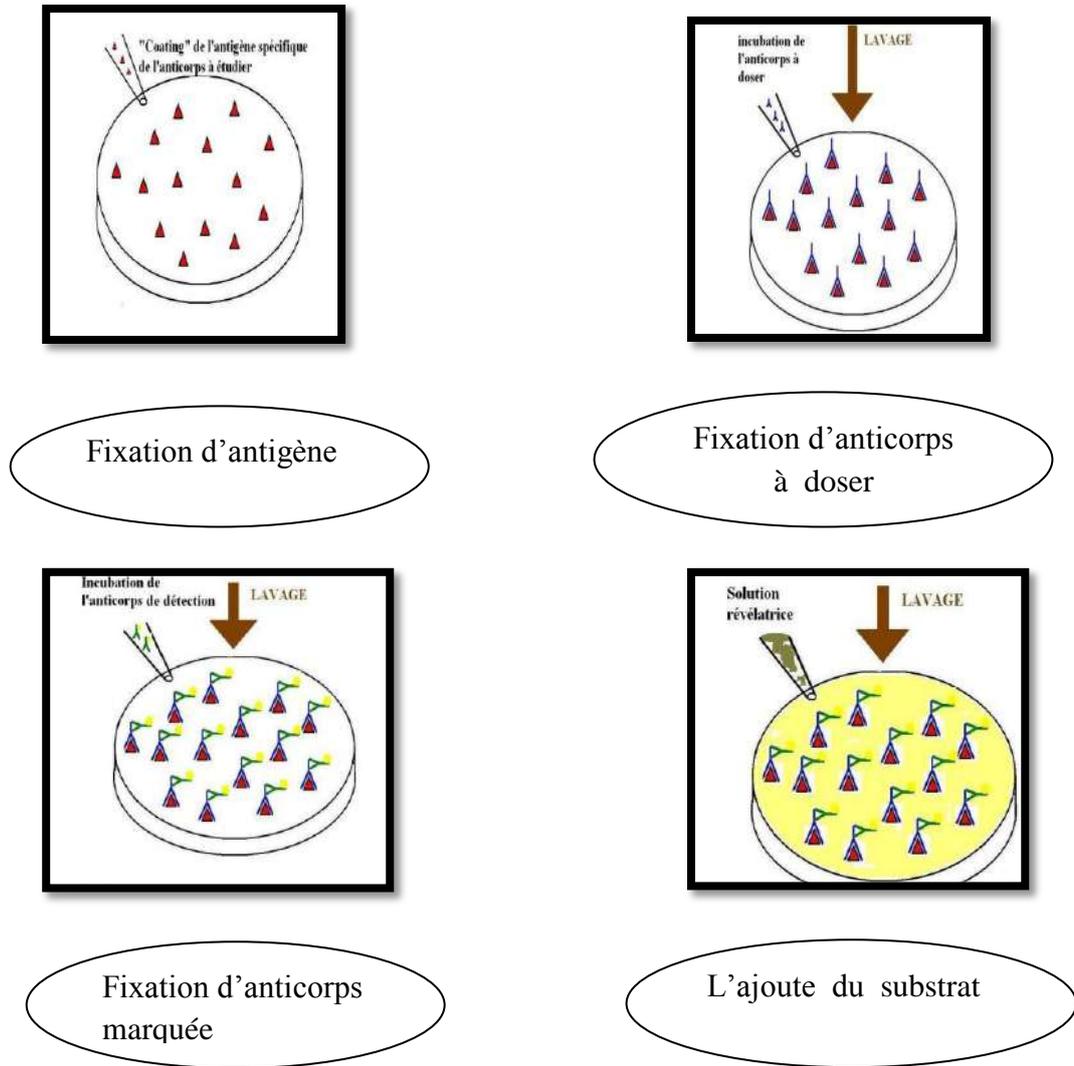


Figure20.. Différents étapes de test ELISA indirecte (Engvall et perlman ,1971)

5-3.Technique de l ELISA sandwich

5-3-1.Dosage d'antigène

5-3-1-1.Dosage d'un antigène par méthode sandwich (sandwich direct)

Principe

Le principe de l ELISA consiste à piéger, entre un « anticorps de capture » et un (anticorps de détection) , les antigènes d'intérêt .

Ces deux anticorps sont généralement spécifiques de l'antigène d'intérêt (parfois l'anticorps secondaire réagit aux complexes antigènes-anticorps) ,l'anticorps de détection est dans la plupart des biotinylé , cette caractéristique lui permet de se fixer à un complexe enzymatiques (une peroxydase , telle la streptavidine –HRP) la détermination des concentrations en antigènes se fait en ajoutant un chromogène ou un fluor gène à ces

complexes , par la lecture (généralement sur microplaques) de densités optiques ou de fluorescence émise (**Voller A et al., 1978**) .

Les étapes

Dans cas de figure, l'antigène se trouve entre 2 anticorps spécifique, l'utilisation de la ELISA nécessite de posséder 2 anticorps monoclonaux reconnaissant des épitopes différents sur l'antigène (**Figure21**) (**Ling et Overby, 1972**)

- La première étape consiste à fixer sur le support, l'anticorps de capture, on incube la solution à 37°C pendant 2 heures puis lavage ou une nuit à 4°C puis lavage.
- Lors de la deuxième étape, on dépose l'échantillon possédant l'antigène à identifier qu'on pendant 2 heures puis lavage ou une nuit à 4°C puis lavage.
- Dans une troisième étape, on fixe l'anticorps de détection marqué avec une enzyme sur l'antigène recherché pour cela, on dépose la solution d'anticorps dans les puits puis on incube l'ensemble à 37°C pendant 2 heures.
- La dernière étape, on dépose une solution révélatrice contenant le substrat pour l'enzyme et on laisse incuber pendant 30 à 120 minutes, le produit de réaction obtenu est soluble et coloré, l'intensité de cette coloration peut être mesurée à l'aide d'un photomètre.

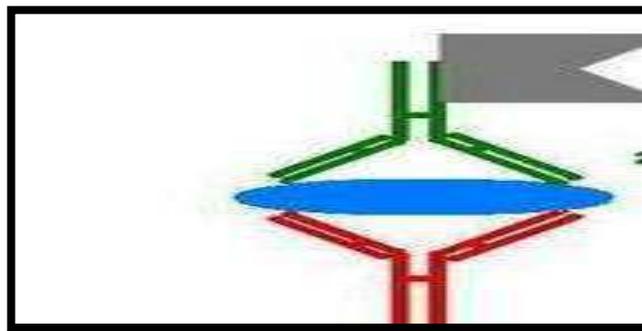


Figure21 .. Double anticorps sandwich ELISA direct (**Ling et Overby, 1972**)

5-3-1-2. Dosage d'un antigène par la méthode du double sandwich (sandwich indirect)

Le test ELISA sandwich est très sensible et robuste et est probablement le plus utilisé des formats ELISA, Dans un ELISA sandwich, l'immobilisation de l'analyte est indirecte, comme décrit ci – dessus et illustré à la figure (**Figure22**).

- Un anticorps de capture spécifique de l'analyte ou de l'antigène cible est déposé sur la surface d'une plaque de micro titrage.

- L'échantillon à tester est appliqué, et tout analyte cible (A) présent est lié par l'anticorps de capture.
- Un deuxième anticorps (appelé anticorps de détection) est ensuite appliqué et se lie à l'analyte cible qui reste lié à l'anticorps de capture.
- De cette façon, la cible est prise en sandwich entre deux anticorps, chacun d'entre eux étant spécifique d'une région ou d'un épitope différent et non chevauchant de l'analyte .
- Un conjugué d'anticorps secondaire est ajouté, celui-ci se lie à l'anticorps de détection et réagit avec un substrat pour produire un signal qui est détectable sur l'un des instruments énumérés ci-dessus (Fanales-Belasio E et al ., 2010) .

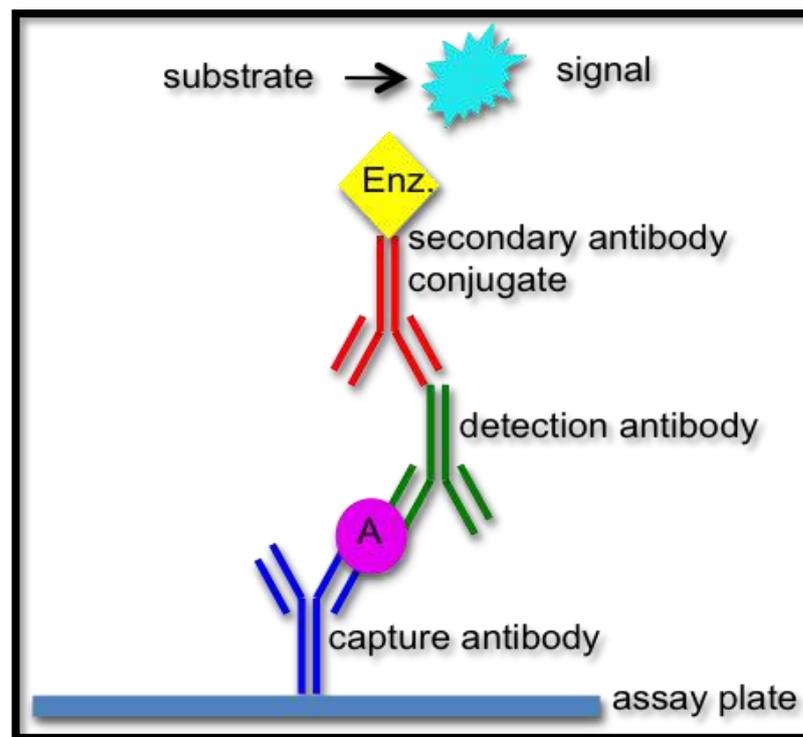


Figure22.. ELISA double sandwich

Source. [https:// nordicbiosite. Com / blog/elisa- principales -101](https://nordicbiosite.com/blog/elisa-principales-101)

5-3-2.Dosage d'anticorps

Principe

Les antigènes du VIH sont fixés sur une phase solide, les anticorps anti-VIH du sérum se fixent sur les antigènes de la phase solide, ils forment un complexe antigènes – anticorps, un conjugué enzyme antigène est ajouté après lavage et il se lie à tout anticorps anti-VIH présent, on procède ensuite à un lavage pour éliminer le conjugué non lié, on rajoute du substrat et

une coloration apparait proportionnellement au taux d'anticorps présente (**Figure23**) (Ivens KO et al .,2016) .

Les étapes

- ✓ La première étape consiste un antigène de capture spécifique de anticorps cible est déposé sur la surface d'un plaque de micro titrage puis en laver pour élimine les excès.
- ✓ L'échantillon à test est applique et tous l'anticorps cible présent est liée par l'antigène de capture puis en laver pour élimine les excès.
- ✓ Un deuxième antigène (appelle antigène de détection) ,L'antigène de détection se fixent spécifiquement sur l'anticorps à dose , les puits sont lavés pour élimines les antigène de détection en excès avec le tampon de lavage , l'antigène de détection sont couplée à un enzyme qui en présence de son substrat le transformé en produit de réaction détectable et mesurable grâce à l'apparition d'un coloration .

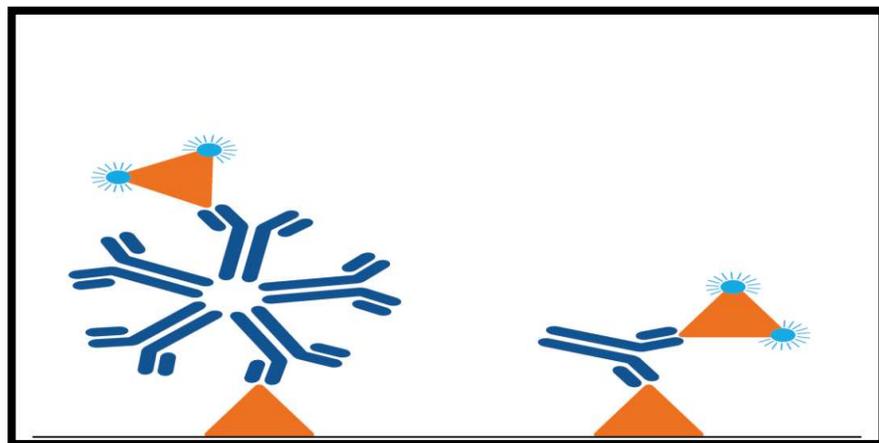


Figure23. Doubl antigen bridging assay

Source. <https://thenative Antigen Company. Com / elisa – kit>

5 - 4 .Techniques d'ELISA compétition

✓ Etat un :

Dans un ELISA compétitif ,un antigène de référence est lié au fond des puits de la microplaque .L'échantillon plus l'anticorps sont ajoutés aux puits , et si un antigène est présent dans l'échantillon ,il est compétition avec l'antigène de référence pour se lier à l'anticorps .La substance non liée est éliminée .Plus la quantité d'antigène est important dans l'échantillon , plus la quantité d'anticorps liée par l'antigène de référence au fond des puits est faible , et plus le signal est faible(**Figure24**). .

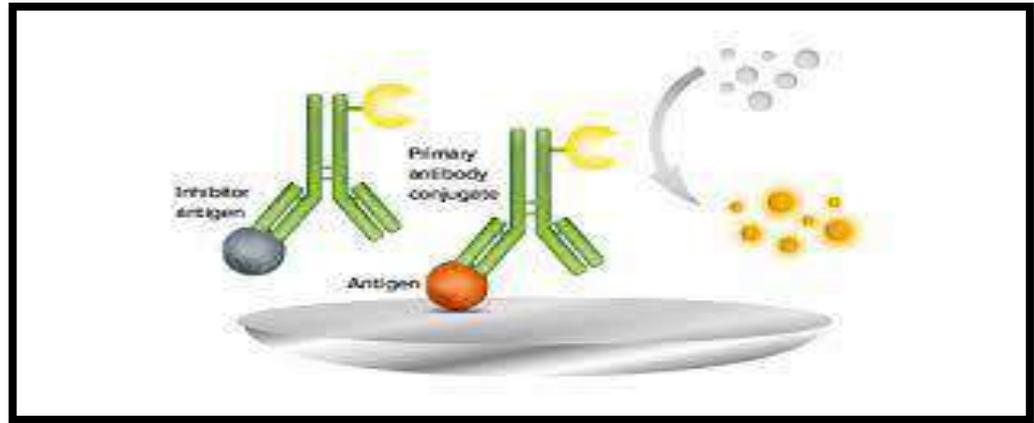


Figure 24. ELISA compétition entre antigène de référence et antigène d'échantillon
 Source ; <https://fr.moleculardevices.com/applications/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa>

✓ **Etats deux :**

Cette variante permet le dosage d'un antigène en utilisant le principe de compétition de liaison :

1. Une plaque est préparée sur laquelle sont fixés des anticorps.
2. Un mélange d'antigènes marqués et des antigènes à doser (non marqués) est déposé sur la plaque.
3. La plaque est rincée, de sorte que les antigènes non liés aux anticorps sont éliminés.

La compétition joue donc entre les antigènes marqués (en quantité connue) et non marqués (en quantité à déterminer) pour leur liaison aux anticorps, qui sont en défaut. Ainsi plus les antigènes à doser sont nombreux, plus leur proportion parmi les antigènes retenus par les anticorps est grande, et plus le signal sera faible. Inversement, si la concentration initiale de l'antigène est faible, le signal sera fort (**For.A et al ., 2003**)

✓ **Etats trois.**

Méthodes en phase hétérogène : la phase hétérogène est constituée une phase solide (paroi du tube, de la microplaque, billes magnétiques) sur laquelle est fixé l'anticorps ou l'antigène (ou haptène) . La fixation peut être faite par simple adsorption (sur le plastique) ou par différents types de liaisons plus spécifiques .Ces méthodes nécessitent une étape de lavage pour éliminer l'excès de marqueur qui ne s'est pas fixé (**Fisher J et al ., 2001**)

▪ **Dosage d'un antigène (ELISA compétition)**

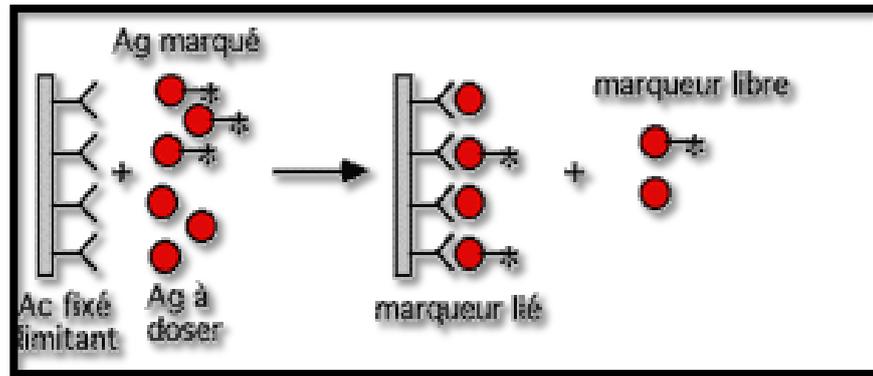


Figure25.Dosage d'antigènes (Fisher J et al ., 2001)

▪ Dosage d'un anticorps (ELISA compétition)

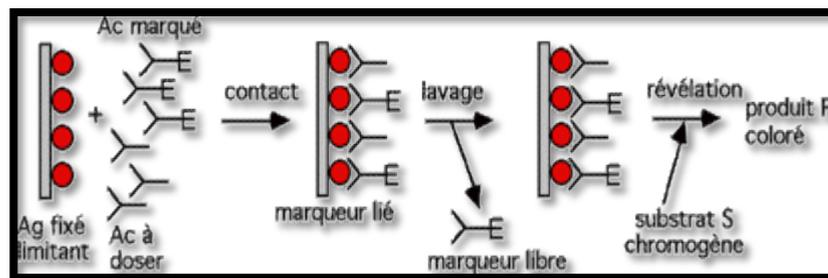


Figure 26.. Dosage d'anticorps (Fisher J et al ., 2001)

6. Les avantages et les inconvénients des types ELISA

Tableau 9.comparaison entre les types des tests ELISA et les avantages et Inconvénient Agut H et al.,2014) .

<u>Protocols</u>	<u>Détection</u>	<u>Avantage</u>	<u>Inconvénient</u>
ELISA direct	Antigène	<ul style="list-style-type: none"> • Protocole efficace en termes de temps, sans réactivité croisée de l'anticorps secondaire • Moins de risques d'erreur, car moins de réactifs et d'étapes sont nécessaires 	<ul style="list-style-type: none"> • Temps nécessaire et faible flexibilité avec un signal de fonde élève • L'immobilisation de l'antigène n'est pas spécifique - peut provoquer un bruit de fond plus important que le test ELISA indirect. Principalement parce que toutes les protéines de l'échantillon, y compris la protéine cible, se lieront à la plaque
ELISA indirect	Anticorps	<ul style="list-style-type: none"> • Très polyvalent et sensible grâce à l'utilisation d'anticorps secondaires marqués • Economique car moins d'anticorps marqués sont utilisée • Différentes stratégies de détection peuvent utilisée (calorimètre, chimiluminescences) 	<ul style="list-style-type: none"> • Risques de réactivité croisée avec l'anticorps secondaire • Protocole complexe avec une étape supplémentaire par rapport à ELISA direct

<p>ELISA sandwich</p>	<p>Antigène et anticorps</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Protocole très flexible, sensible et spécifique car deux anticorps se lient au même antigène à des sites de liaison différents • Différentes stratégies de détection peuvent être utilisées (colorimétrie, chimiluminescence) 	<ul style="list-style-type: none"> • L'antigène d'intérêt doit être suffisamment grand pour permettre la fixation des anticorps à différents de liaison • L'optimisation des anticorps peut être difficile - une réactivité croisée peut se produire entre les anticorps de capture et de détection. Nécessite un kit ELISA normalisé ou une paire d'anticorps testés
<p>ELISA compétitions</p>	<p>Antigène et anticorps</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Idéal pour les échantillons ayant une faible concentration d'antigène cible • aucun traitement de l'échantillon n'est nécessaire et des échantillons bruts ou impurs peuvent être utilisés 	<ul style="list-style-type: none"> • Les antigènes ayant une petite taille et un nombre limité de sites de liaison des anticorps sont évalués • Mêmes limites que l'ELISA de base - car chaque technique ELISA peut être adaptée à un format compétitif

7. Les avantages et inconvénients de la technique

(Engavall et perlman ,1971)

7-1.Avantages

(Engavall et perlman ,1971)

- L'utilisation d'anticorps monoclonaux rend la détection spécifique.
- Possibilité de quantifier grâce à la réalisation d'une gamme en parallèle.
- L'utilisation d'anticorps secondaires rend les techniques sensibles.
- Technique accessible à tous les biologistes.
- La détection du signal ne nécessite pas la présence d'appareil spécialisé.

7-2.Inconvénients

- La limite de détection est moins bonne que la technique RIA (Engavall et perlman ,1971)
- La réaction enzymatique rend cette technique dépendante de la température, du pH et de l'éclairement (Engavall et perlman ,1971)
- L'ELISA a une spécificité limitée, des réactions faussement négatives peuvent se produire pendant la fenêtre sérologique c'est-à-dire avant la séroconversion. Il est aussi possible que des individus séronégatifs puissent réagir positivement. Ce phénomène est observé spécialement chez les femmes multipares, car elles possèdent des anticorps dirigés contre les antigènes HLA (d'où des réactions faussement positives). C'est pourquoi l'ELISA n'est pas un test de confirmation. un résultat sérologique positif ne doit être rendu ou communiqué au patient sans confirmation par la méthode western blot ou la RIPA, ou un autre test ELISA (Person JM ,1978)

8. Composition du kit ELISA

❖ plaques ELISA

La plaque est composée

Format des plaques

Les plaques à 96 puits à fond plat en chlorure de polyvinyle sont utilisées dans la grande majorité des tests ELISA. On peut également utiliser une plaque à barrettes de puits :

il s'agit d'un cadre de la taille d'une plaque à puits qui est peuplé d'autant de barrettes de 8 ou 12 puits que l'expérience le requiert. Elles nécessitent une manipulation automatisée et sont donc presque exclusivement utilisées pour le criblage à haut débit. Certains substrats enzymatiques, tels que ceux qui produisent des signaux fluorescents ou chimio luminescents, peuvent nécessiter des plaques opaques pour des résultats optimaux (**Crowther JR .,2009**)

❖ Tampon

✚ Tampon de blocage

Le blocage est souvent nécessaire pour empêcher la liaison non spécifique des anticorps de détection à la surface de la plaque multi-parois. Il existe deux types principaux d'agents de blocage : les protéines et les détergents, Les protéines sont classées comme agents de blocage permanent et sont donc ajoutées après que l'anticorps de capture ait été adsorbé à la surface du puits(**Crowther JR .,2009**).

✚ Tampon de lavage

Étant donné que le test ELISA utilise la liaison de surface pour la séparation, des étapes de lavage sont répétées entre chaque étape pour éliminer les matériaux non liés. Les étapes de lavage sont une partie critique du processus et consistent à remplir entièrement les puits avec un tampon, généralement du PBS avec une petite concentration d'un détergent non ionique tel que le Tween-20(**Crowther JR .,2009**).

✚ Tampons d'enrobage

L'enrobage est la première étape de tout test ELISA. Il s'agit du processus au cours duquel un antigène ou un anticorps convenablement dilué est incubé jusqu'à ce qu'il soit adsorbé à la surface du puits. L'adsorption se produit passivement en raison des interactions hydrophobes entre les chaînes latérales des acides aminés de l'anticorps ou de l'antigène utilisé pour l'enrobage et la surface en plastique(**Crowther JR .,2009**).

❖ Anticorps

Les anticorps utilisés dans les tests ELISA peuvent être monoclonaux, poly clonaux ou une combinaison des deux. Chaque type d'anticorps offre des avantages distincts dans le développement des tests ELISA, il est donc important d'apprécier les différences entre ces avantages pendant le développement des tests ELISA(**Crowther JR .,2009**) .

L'interaction entre les anticorps et leur antigène est décrite de trois façons : la spécificité, l'affinité et l'avidité. Pendant le développement d'un test ELISA, ces facteurs influencent le degré d'optimisation de la concentration des anticorps et des tampons requis.

- ✓ **La spécificité** indique si un anticorps se lie uniquement à un épitope unique d'un seul antigène d'une seule espèce ou s'il se lie à des épitopes similaires présents sur plusieurs molécules de quelques espèces différentes. La réactivité croisée est le contraire de la spécificité.
- ✓ **L'affinité** décrit la force de la liaison d'un anticorps à un épitope unique puisque la liaison est réversible. L'affinité détermine la quantité d'antigène liée par un anticorps, la rapidité avec laquelle la liaison se produit et la durée de celle-ci. Les anticorps à haute affinité sont le meilleur choix pour tous les types d'essais immunologiques car ils produisent rapidement le plus grand nombre de complexes immuns stables et fournissent donc la détection la plus sensible.
- ✓ **L'avidité** est un terme plus complexe qui rend compte de la stabilité totale de l'interaction entre l'anticorps et l'antigène. Elle est basée sur l'affinité mais est également influencée par la valence de l'anticorps ou par le nombre total de sites de liaison à l'antigène ; ainsi, l'avidité varie selon l'isotype et selon que l'anticorps est intact ou fragmenté.

Anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux sont homogènes par définition, avec une spécificité pour un épitope unique ou une petite région d'une protéine. Par conséquent, ils sont moins susceptibles d'interagir avec des protéines étroitement liées et ne sont généralement pas censés déclencher des signaux non spécifiques dans un essai immunologique donné (**Crowther JR .,2009**).

Les anticorps monoclonaux peuvent être utilisés pour toutes les étapes contenant des anticorps dans tous les types d'ELISA ; ils sont couramment utilisés dans des ensembles de paires appariées dans les ELISA en sandwich mais peuvent être utilisés pour la capture ou la détection en conjonction avec un anticorps poly clonaux pour améliorer le signal ou pour fournir une plus grande chance de capturer l'antigène d'une solution complexe.

Anticorps poly clonaux

Les anticorps poly clonaux sont des pools d'anticorps complexes qui représentent une collection de spécificités à divers épitopes trouvés dans un antigène unique ; certains épitopes

prédominant ou il peut y avoir une large représentation des épitopes disponibles dans un antigène donné ; les anticorps poly clonaux peuvent varier de manière significative d'un lot à l'autre et doivent être testés et validés de manière approfondie (**Crowther JR .,2009**).

En raison de leur hétérogénéité et de la large représentation des épitopes présents, les anticorps poly clonaux peuvent être des outils puissants pour la détection approfondie d'un antigène, produisant souvent des niveaux de signal plus élevés ; il est également rare qu'ils ne parviennent pas à se lier en raison d'un seul site de liaison bloqué, d'un changement de configuration de l'antigène ou d'un mauvais repliement ; cependant, les anticorps poly clonaux sont également plus susceptibles de partager un ou plusieurs épitopes avec des protéines étroitement liées, ce qui entraîne un signal non spécifique plus élevé ; une solution pour réduire ce problème consiste à utiliser des anticorps poly clonaux purifiés par affinité ou à absorption croisée(**Crowther JR .,2009**)

✚ Paires appariées

Les paires appariées sont à la base de nombreux tests ELISA sandwich, que ce soit dans des kits ou pour la mise en place de tests en interne. Le nom fait référence à des ensembles d'anticorps qui sont connus pour être capables de détecter différents épitopes sur le même antigène protéique, de sorte qu'ils peuvent être utilisés ensemble pour la capture et la détection d'un seul antigène dans un test ELISA sandwich ou un immunodosage apparenté. Les paires appariées peuvent être constituées de deux anticorps monoclonaux, de deux anticorps poly clonaux ou d'une combinaison des deux. Si un anticorps monoclonal et un anticorps poly clonaux sont utilisés ensemble, l'anticorps monoclonal doit être utilisé comme anticorps de revêtement. S'il est utilisé comme anticorps de détection, son épitope peut être masqué par un clone composant de l'anticorps poly clonaux, ce qui entraîne une réduction ou une perte du signal (**Crowther JR .,2009**).

❖ .Manipulation et préparation des échantillons

Une grande variété d'échantillon peut être testée dans un ELISA et le choix des conditions de test dépendra de la complexité de l'échantillon et de la quantité d'antigènes présents.

Les échantillons sont généralement considérés comme homogènes ou hétérogène, en fonction de leur complexité. Cela équivaut essentiellement à un antigène purifié par rapport à un mélange brut non purifié. Dans le cas le plus simples, les échantillons ELISA sont dilués dans du PBS, du tampon de lavage ou d'autres tampons spécialisés, et appliqués dans un volume final de 100 μ .

Le sang présente des défis particuliers en raison des protéines présentes qui peuvent perturber les résultats du test. Comme les sérums peuvent contenir des anticorps, il peut également y avoir une réactivité croisée inattendue. Par conséquent, des traitements et des tampons spéciaux sont parfois nécessaires pour la dilution des échantillons de sang afin d'obtenir des résultats optimaux (Crowther JR., 2009).

❖ Substrat et enzyme

L'étape finale d'un test ELISA est la réaction catalysée par l'enzyme pour obtenir un produit final coloré qui peut être lu dans un spectrophotomètre sous forme de valeurs d'absorbance, représentant la concentration de l'analyte.

La peroxydase (HRP) de raifort sauvage est une enzyme courante utilisée dans l'ELISA, alors que les substrats comprennent le tétraméthylbenzidine (TMB) acceptable (Dutta et al., 2019).

9. Les différents éléments du test

Phase solide

Différentes classes de supports ELISA sont disponibles dans le marché en plusieurs formats et matériaux de support. Les plateformes les plus connues sont les plaques à micro puits, les petites boules et les petits tubes. Régulièrement les microplaques sont conçues sous la forme de plaques à 96 puits. Ces plaques courantes à des fins de détection comportent 8 à 12 puits une caractéristique qui peut être utilisée pour l'analyse d'un grand nombre d'échantillons en même temps. Les plaques à 96 puits sont généralement fabriquées en polystyrène (PS), qui est un matériau économique très transparent et relativement hydrophile, adapté à l'adsorption des protéines [bio rad].

Adsorbants

Lors de la réalisation d'immun-essais, plusieurs types d'adsorbants différents peuvent être utilisés en fonction des protocoles ELISA. Les anticorps (produits en réponse à des stimuli antigéniques) et les antigènes sont les principaux adsorbants utilisés en ELISA (Asensio L et al., 2008).

10. Condition de conservation et manipulation

La trousse doit être gardée à +2-8 C°. Chaque élément de la trousse conservé à +2 – 8 peut être utilisé jusqu' à la date d'expiration indiquée sur le coffret (sauf indication spécifique).

Après ouverture et en présence de contamination, les réactifs (composition de la trousse) conservés à +2-8 C° sont stables jusqu' à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette (**Barre S, 1983**).

Tableau 10.L'identification et conservation des compositions de trousse ELISA (**Barre S, 1983**).

Identification	Conservation
micro plate	Après ouverture du sachet sous vide, les barrettes conservées à +2-8 C° sont stables pendant 1 mois dans leur sachet d'origine refermé avec soin.
Concentrated washing solution	La solution de lavage diluée peut être conservée à +2-30C° pendant 2 semaines. la solution de lavage concentrée peut être conservée à +2-30 C°.
Conjugate	Après reconstitution n les réactifs peuvent être conservée à +2-30C° pendant 1 mois après reconstitution, les réactifs congelés peuvent être conservée jusqu' à la date d'expiration indiquée sur le coffret (jusqu' 11 cycles de congélation /décongélation).
Substrata buffer and chromo gene solution	Après reconstitution, les réactifs conservés à l'obscurité sont utilisable pendant 6 heures à température amiante 18-30 C°.

11. Les résultats d'ELISA

Le test ELISA permet d'obtenir trois types de données différentes (**Crowther JR .,2009**)

11-1.Quantitatif

Les données ELISA peuvent être interprétées par rapport à une courbe standard (une dilution en série d'un antigène connu et purifié) afin de calculer précisément les concentrations d'antigène dans déférents échantillons.

11-2.Qualitatif

Les tests ELISA peuvent également être utilisés pour obtenir une réponse par positive ou négative indiquant si un AG particulier est présent dans un échantillon, par rapport à un puits vide ne contenant aucun antigène ou un antigène de contrôle non lié. L'inclusion d'un seul contrôle positif à niveau fixe peut être utilisée pour donner un critère oui/non pour le niveau minimum d'antigène.

11-3.Semi-qualitatif

Les tests ELISA peuvent être utilisés pour comparer les niveaux relatifs d'AG dans les échantillons analysés, puisque l'intensité du signal varie directement avec la concentration d'AG

11-4.Courbe standard

Les données ELISA sont généralement représentées graphiquement avec la densité optique en fonction de la concentration logarithmique pour produire une courbe sigmoïdale comme illustré à la (**figure 27**) , des concentration connues d'antigène sont utilisées pour produire une courbe standard , puis ces données sont utilisées pour mesure la concentration d'échantillons inconnus par comparaison avec partie linéaire d'un logiciel d'ajustement de la courbe que l'on trouve généralement sur les lecteurs de plaques ELISA .

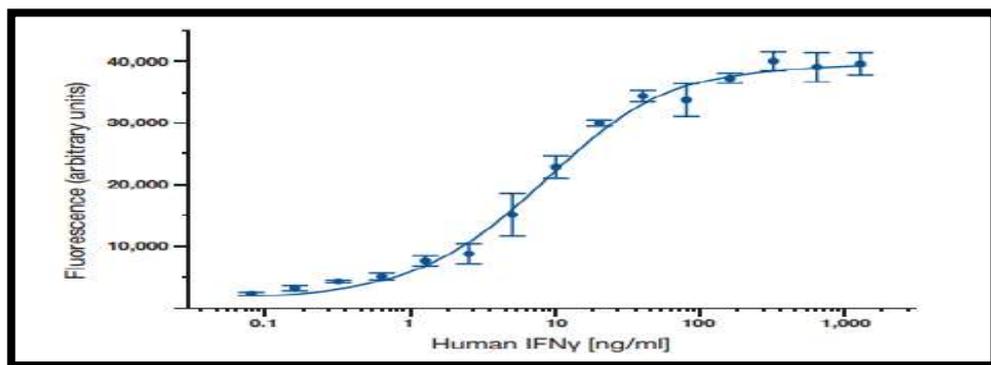


Figure 27. Courbe standard d'ELISA (Crowther JR .,2009)

11-5.Modèles de courbe d'étalonnage

Si un résultat quantitatif est nécessaire, la façon la plus simple de procéder est de faire la moyenne des lectures des trois étalons et de déduire la lecture de l'échantillon témoin. Ensuite, il faut tracer la courbe standard, trouver la ligne de meilleur ajustement ou au moins Dessiner une courbe point à point afin de pouvoir. Déterminer la concentration des échantillons.

12 .Biomolécules ciblées

12-1 .Concernant l'antigène p24

- L'un des antigènes distinctifs du VIH(**Figure28**). est une protéine virale appelée p24, une protéine structurale qui constitue la majeure partie du noyau viral du VIH, ou "capside". Des taux élevés de p24 sont présents dans le sérum sanguin des personnes nouvellement infectées par le VIH pendant la courte période entre l'infection et la séroconversion, ce qui rend les tests de l'antigène p24 utiles pour le diagnostic de la primo-infection par le VIH. De nombreux tests VIH recherchent l'antigène p24 en plus des anticorps au VIH. Ces tests sont parfois appelés tests de quatrième génération (ces tests peuvent également être appelés tests d'ELISA).
- Les anticorps anti-p24 sont produits pendant la séroconversion, ce qui rend l'antigène p24 indétectable après la séroconversion dans la plupart des cas. Par conséquent, les tests de détection de l'antigène p24 ne sont pas fiables pour diagnostiquer une infection par le VIH après ses tout premiers stades. Cependant, l'infection par le VIH peut être diagnostiquée de manière fiable et plus tôt avec des tests combinés anticorps/antigène qu'avec des tests détectant uniquement les anticorps (**Fred the Oyster, 2014**)

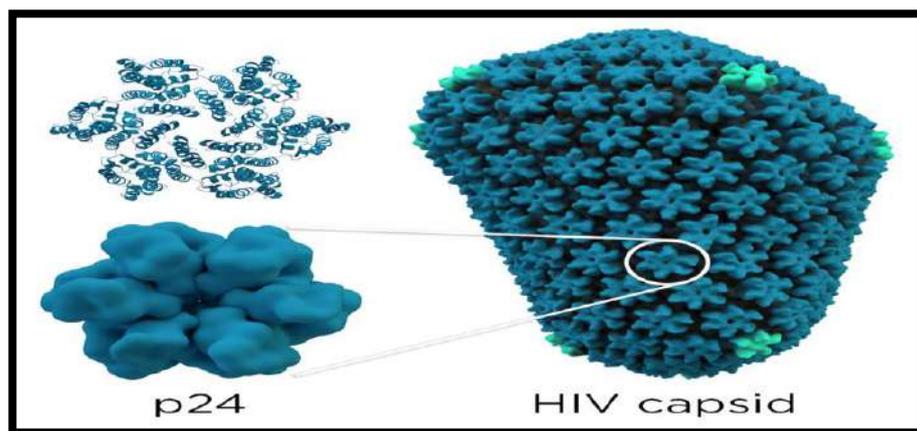


Figure 28.La structure de la p24 (**Fred the Oyster, 2014**).

12-2.Détection d'immunoglobuline G

L'IgG(**Figure29**). est l'anticorps le plus abondant et le plus diversifié du plasma, représentant 75 à 85 % des anticorps circulants. Il protège contre les bactéries, les virus et les toxines circulant dans le sang et la lymphe, fixe facilement le complément et constitue le principal anticorps des réponses secondaires et primaires tardives. Il traverse le placenta et confère une immunité passive de la mère au fœtus. (**Harris LJ et al ., 1997**)

leur poids moléculaire est de 150000 Da et leur constante de sédimentation 6,8S les IgG fixent le complément de nombreuses cellules Ont un récepteur de surface capable de lier fragment Fc des IgG et la fixation des immunoglobulines à ces récepteurs explique leur rôle dans la promotion de la phagocytose par les polynucléaires et les macrophages (polonisation), dans le phénomène de cytotoxicité dépendant des anticorps –ADCC et dans l’agrégation plaquettaire par les complexes immuns (**Person JM ,1978**).

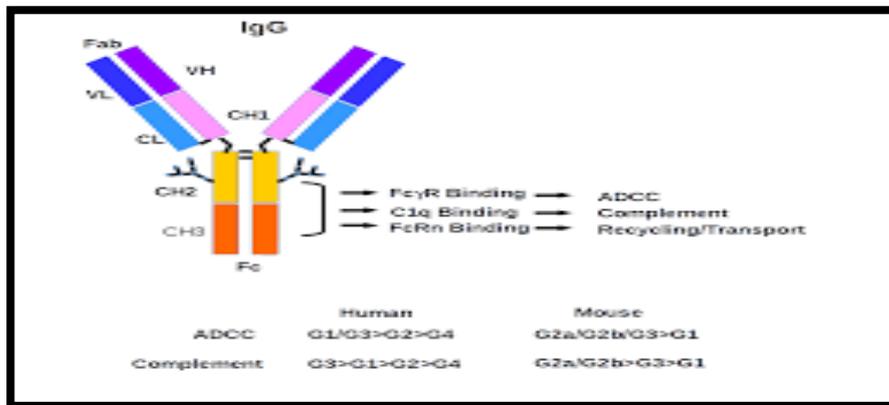


Figure29.La structure de l’immunoglobuline IgG (**Person JM ,1978**).

La méthode ELISA qui permetre la détection de IgG(**Figure 30**).

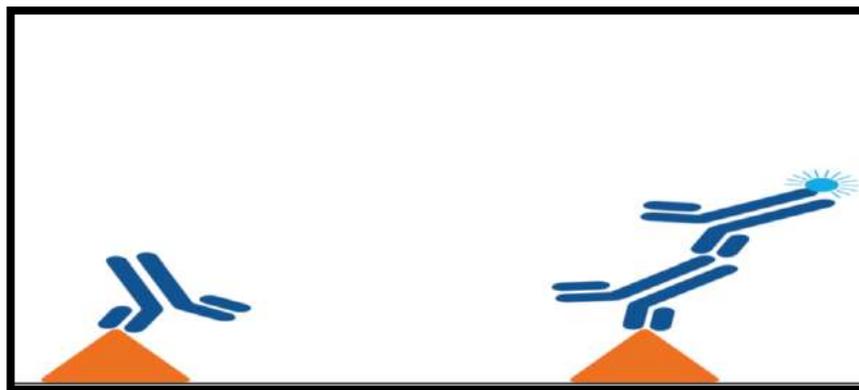


Figure 30.antigène IgG dans ELSA

Source; [https://thenativeAntigenCompany. Com / elisa – kit /](https://thenativeAntigenCompany.Com/elisa-kit/)

12-3 .L'immunoglobuline M

L'IgM(**Figure31**). existe sous forme de monomère et de pentamère (cinq monomères réunis). Le monomère, qui est fixé à la surface de la cellule B, sert de récepteur d'antigène. Le pentamère circule dans le plasma sanguin et constitue la première classe d'IgM libérée par les plasmocytes au cours de la réponse primaire (ce fait est utile pour le diagnostic car la présence d'IgM dans le plasma indique généralement une infection en cours par l'agent pathogène qui a

provoqué la formation d'IgM). En raison de ses nombreux sites de liaison à l'antigène, l'IgM est un agent d'agglutination puissant et fixe et active facilement le complément (Morrison S et al., 2001)

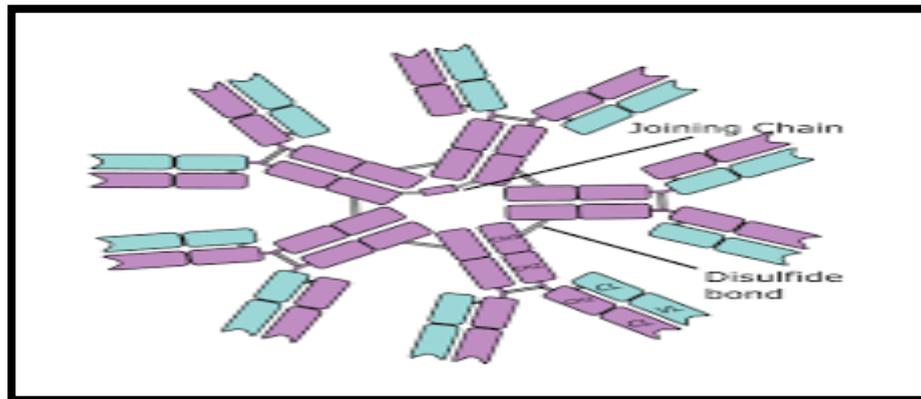


Figure31. La structure de l'immunoglobuline IgM (Person JM ,1978).

La méthode ELISA qui permet de détecter l'IgM (Figure32).

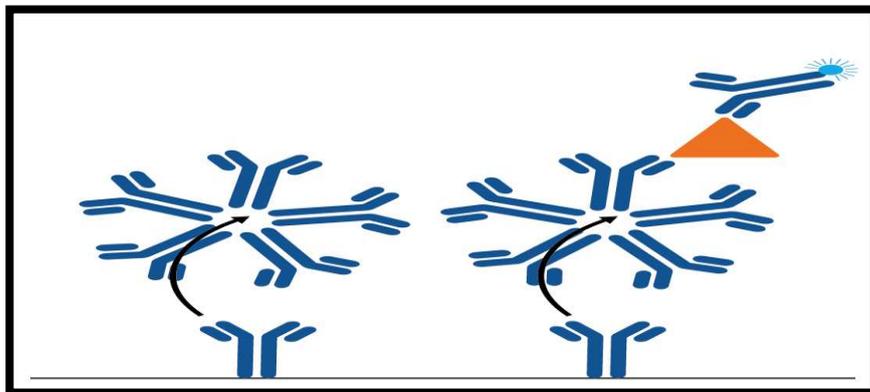


Figure32. IgM capture ELISA

Source: <https://thenative Antigen Company. Com / elisa - kit />

13. La fiabilité de dépistage

La fiabilité d'un test s'exprime par deux mesures ; la sensibilité et spécificité

(Delfraissy J-F, 1999) .

- **La sensibilité** ; montre la capacité du test à donner un résultat positif lorsque l'infection est présente, plus la sensibilité est bonne plus le risque de faux négatifs diminue, on appelle faux négatif le fait qu'un test donne un résultat négatif alors que la personne est séropositive

- **La spécificité** ; montre capacité du test à donner un résultat négatif lorsque l'infection n'est pas présent, plus la spécificité est bonne plus le risque de faux positifs diminue, on appelle faux positif le fait qu'un test donne un résultat positif alors que la personne est séronégative.

Tableau11.La fiabilité dépistage (Delfraissy J-F,1999)

		VIH		Sensibilité	Fiabilité
		Absent	Présent		
Test	Positif	Faux positives	Vrai positif		
	Négatif	Vrai négatifs	Faux négatifs	Spécificité	

La capacité des différents tests à détecter correctement le VIH dépend d'un mélange de sensibilité et de spécificité, la sensibilité d'un test désigne le pourcentage de résultats positifs chez les personnes qui sont réellement infectées.

Plus les pourcentages est haut, plus le test est sensible ; un test qui est sensible à 100 pourcent ne produira pas de faux négatifs, la spécificité d'un test se réfère au pourcentage de résultats négatif chez les personnes qui sont séronégatifs, plus le pourcentage est élevé, plus la spécifié du test est élevée ; un test qui est 100 pourcent spécifique ne produira pas de faux positifs.

Les faux positifs et les faux négatifs peuvent tous deux avoir des conséquences néfastes, les faux positifs peuvent être traumatisants, mais ils sont souvent identifiés rapidement via un test de conformation, les faux négatifs, de leur cote, ne requiert pas de test de conformation et peuvent ne pas être remarqués avant le test suivant, ce qui crée des opportunités de transmission inconsciente (Karris M , 2012) .

14. Les germes des faux positif et faux négatif

Tableau 12. Les germes des faux positif et négatif

<u>Les germes de faux positif</u>
<ul style="list-style-type: none"> • Toxoplasme gondii (Ajoka JK et al .,2007) • Mycobatérium tuberculoses (Gaudelus J .,2002) • Hépatite c (Chevaliez S et al ., 2009) • Systemic lupus erythematosus (Tunncliffe DJ et al ., 2015) • Syphilis congénitale (Pagon B et al ., 2011)

15. Les limites de détection d'ELISA

15-1. Cinétique des marqueurs sériques au cours de l'infection à VIH-1

Au cours de l'évolution de l'infection apparaissent successivement les marqueurs(**Figure33**). suivants (**Ivens KO et al., 2016**)

- L'ARN viral ;
- L'antigène p24 , l'ADN pro viral ;
- Les anticorps anti-VIH apparaissent à un niveau détectable, 6 à 8 semaines après l'infection.

Ils sont essentiellement dirigés contre deux catégories de protéines de structure virales :

- Les glycoprotéines de l'enveloppe (gp120 ; gp41 ; gp 160)
- La protéine majeure du core

Quand la maladie progresse, les anticorps dirigés contre les autres protéines virales (p17 ; transcriptases inverse (p66 /51) ; endonucléase (P 34) ; et protéines de régulation) deviennent détectables. Mais, ils ne sont pas retrouvés dans la même proportion : leur Quantité varie selon le stade de la maladie. Les anticorps dirigés contre les glycoprotéines de l'enveloppe demeurent présent jusqu' au stade terminal.

Remarque : la cinétique des anticorps anti-VIH-2 est très faiblement documentée (**Ivens KO et al., 2016**) .

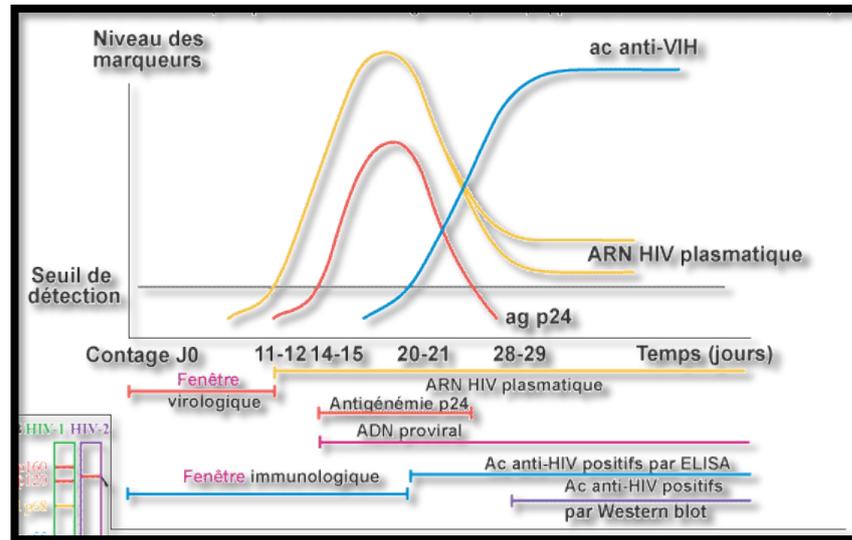


Figure 33. La cinétique des marqueurs du VIH-1 (Ivens KO et al., 2016)

15-2. Reaction croisées

Une réaction croisée est un faux positif produit par des interactions avec d'autres molécules dans les fluides corporels, elle se produit chez les personnes atteintes d'hypergamie-maglobulinémie, celles qui ont été récemment vaccinées contre l'hépatite B ou la grippe et/ou personnes dont les anticorps ont des caractéristiques similaires aux anticorps du VIH (par ex, les anticorps dirigés vers d'autres agents infectieux), la grossesse peut aussi produire des faux positifs à cause des réactions croisées avec des molécules similaires aux antigènes du VIH qui sont présentes dans le placenta normal (Castel A et al., 2012)

16. Application de la technique ELISA

16-1. Diagnostic biologique

Dans le domaine du diagnostic, le test ELISA s'est avéré être une plateforme appliquée dans le monde entier pour détecter divers types de maladies chez l'homme et l'animal. Un certain nombre de kits ELISA commerciaux sont disponibles sur le marché pour la détection du VIH (Nandi S et al., 2014), de l'influenza (Tarigan S et al., 2015), de la fièvre dengue (Hunsperger EA et al., 2014; Hosseini S et al., 2015) de l'Ebola (Schieffelin Jet al., 2016), de la maladie de Chagas (Aria L et al., 2016), de la Leishmaniose (Lauricella MA et al., 2016)

○ Test de grossesse

Un certain nombre d'entités biomoléculaires, notamment l'hormone chorionique gonadotrope humaine (HCG), l'hormone lutéinisante (LH), l'hormone folliculo-stimulante

(FSH), l'œstriol (E3) et l'hormone thyroïdienne (TSH) peuvent être exprimées en raison de la grossesse. Le test ELISA peut détecter certains des protéines dans le sang maternel, la salive ou l'urine aux premiers stades de la grossesse (**Barnett et al., 2019**)

- **Détection du cancer**

La détection très sensible du cancer permet de poser un diagnostic précoce, ce qui est crucial pour la survie des patients. Cependant, les bio marqueurs du cancer font partie des entités biomoléculaires les plus difficiles à analyser. Les progrès de la technique ELISA promettent ses applications dans la détection des bios marqueurs du cancer (**Chin AR et al., 2016**).

- **Détection du nouveau Coronavirus (SARS-CoV-2/COVID-19).**

Une nouvelle étude de preuve de concept réalisée par des chercheurs britanniques décrit le développement d'un test ELISA qui peut être utilisé lorsque des niveaux plus faibles d'AC spécifiques du coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV-2) sont présents dans les échantillons de sérum et de salive (**Meštrović et al., 2020**)

- **. Détection des maladies infectieuses.**

Même à ce jour, la sérologie infectieuse basée sur le test ELISA constitue l'un des moyens les plus fiables pour un diagnostic et un pronostic précis. La technique d'ELISA a offert une détection à haut débit dans trois classes des maladies infectieuses (**Barnett et al., 2019**) :

- Les maladies sexuellement transmissibles (MST) sont une classe de maladies infectieuses qui a ciblé les adultes dans les pays en développement. Un certain nombre de plateformes ELISA différentes ont été conçues et commercialisées pour la détection sensible et sélective des MST, notamment le VIH, l'hépatite, la syphilis, la chlamydia.
- TORCH fait référence à Toxoplasme, "autres infections", Rubéole, Cytomégalovirus, Herpes simplex, qui est un groupe d'agents pathogènes viraux pouvant entraîner des infections prénatales. Cette catégorie de maladies infectieuses peut constituer une menace potentielle pour les enfants à naître. Des maladies telles que la syphilis, l'hépatite B, le virus d'Epstein-Barr, le virus varicelle-zona, le VIH entrent dans la catégorie des "autres infections" qui peuvent également avoir des conséquences graves pour le fœtus. Les plateformes ELISA commercialisées ciblent avec succès ces agents infectieux dans la pratique clinique actuelle.

16-2.Développement de vaccins

Le test ELISA est un excellent candidat pour le développement de vaccins. L'échantillon de sérum provenant d'un modèle animal ou humain immunisé peut être testé pour détecter la présence d'AC contre certains types d'AG, qui ont été injectés intentionnellement à l'hôte (**Miura K.,2008**). Normalement différents AG sont utilisées pour produire des réactions immunitaires chez l'hôte, parmi ceux qui produisent une réponse de protection plus élevée avec moins d'effets indésirables peuvent être sélectionnée .Le principe défi de l'application du test ELISA au développement de vaccins est le choix approprié des contrôles positifs et négatifs. Au stade expérimental du développement d'un vaccin et lorsqu'il s'agit d'échantillons inconnus, il est particulièrement difficile d'obtenir une précision analytique élevée . Néanmoins, la technique ELISA a prouvé qu'elle occupait une position unique dans le profilage des réponses immunitaires provoquées, qui sont également utilisées pour les essais de vaccins dans le monde entier (**Smalley C et al ., 2016**)

16-3.Immunologie

Le défenseur de l'organisme, le système immunitaire, peut fonctionner en mode cellulaire ou humorale (inné ou adaptatif). La mesure et le suivi des modifications de la réponse immunitaire constituent la base de la compréhension des maladies immunitaires, déverses études ont démontré que l'ELISA est la méthode de référence, rapide et rentable, pour ces mesures et ce suivi (**Orsolini G et al., 2016**). Un grand nombre d'exemple d'application ELISA en immunologie sont rapportés, tandis que certains efforts ont été dirigés vers l'optimisation des protocoles ELISA et la validation \ établissement de leur précision, sensibilité et spécificité pour soutenir la pratique clinique (**Uchida K et al ., 2014**) .

16-4.Surveillance des médicaments et industrie pharmaceutique

Les concentrations des médicaments illicites, tels que des cannabionoids, des amphétamines, opiacés, cocaïne, benzodiazépines, et méthadone, peuvent être déterminées utilisant l'ELISA dans les échantillons d'urine. La méthode peut être également employée pour surveiller les niveaux des concentrations pharmaceutiques en médicaments dans les Patients suivant la demande de règlement, par exemple, les AC anti narcotiques dans des patients d'arthrite rhumatoïde et la maladie inflammatoire de l'intestin (**Barnett et al., 2019**) .

. 16-5.Transplantation

Lorsqu'une transplantation est nécessaire, le test de comptabilité croisée pré-greffe représente l'une des étapes les plus importantes pour la réussite de la transplantation de

l'organe. Par exemple dans de la transplantation hépatique, le taux de survie des receveurs ABO-incompatibles (ABO-I) est relativement élevé. Il est donc très important de développer une mesure efficace et rapide des AC anti-A et anti-B chez les patients avant de recevoir les organes (Sato A *et al.*, 2007) . Une nouvelle classe d'ELISA a été développée pour surveiller ces AC chez les Receveurs.

La méthode ELISA proposée s'est avérée efficace pour mesurer les AC anti-A et anti-A à un stade plus précoce que la technique précédemment appliquée, l'agglutination. Par conséquent, cette stratégie est appliquée à un contribuer à un traitement opportun du rejet humoral dû à l'ABO-I (Sato A *et al.*, 2007) .

16-6.L'industrie alimentaire

Le test ELISA joue un rôle majeur dans l'industrie alimentaire. Il s'agit du principe Platform d'identification des allergènes alimentaires tels que ceux présents dans le lait, les cacahuètes, les noix, les amandes et les œufs (Peng J *et al.*, 2014) ..Ont développé un ELISA Sandwich à base d'AC monoclonaux pour la détection de l'ovalbumine dans les aliments, qui est la cause la plus fréquente d'allergie alimentaire, en particulier chez les enfants. L'ELISA peut également être utilisée pour corroborer l'authenticité des produits alimentaires. Cette technique est d'une grande utilité pour éviter les éventuelles pertes économiques causées par des substitutions frauduleuses (Asensio L *et al.*, 2008)

17. Les contrôles

Dans chaque expérience ELISA réalisée, il existe différents types de contrôles qui servent des objectifs spécifiques. Certains des principaux contrôles sont les suivants (Crowther JR .,2009) :

17-1.Les contrôles positifs

Les échantillons qui contiennent certainement l'analyte d'intérêt sont appelés contrôles positifs. Ils sont rendus intentionnellement positifs pour contrôler la performance de l'essai.

17-2.Les contrôles négatifs

Les répliques négatives sont des échantillons qui ne contiennent pas l'analyte d'intérêt. Ils servent à vérifier que l'essai ne se lie pas de manière non spécifique. Dans un cas idéal, un test hautement spécifique ne devrait produire aucun résultat de détection pour les contrôles négatifs.

18 .Limite de détection (LOD)

La limite de détection (LOD) est la quantité la plus faible d'un analyte ciblé que le test peut détecter avec une confiance assurée. La limite du blanc (LOB) est le signal de détection le plus faible enregistré pour les contrôles à blanc. On s'attend à ce que la LOD prenne des valeurs plus importantes que la LOB [5]. Ce paramètre spécifique (LOD) est d'une grande importance, en particulier lorsqu'il s'agit de la détection précoce de tout type de maladie (Armbruster DA.,2008)

19 .Précision

La précision est un autre paramètre important de l'évaluation des tests. La précision est généralement calculée en associant les résultats négatifs et positifs (vrai et faux) par rapport au nombre total de répétitions effectuées. En outre, les tests effectués doivent être calibrés en exécutant le test avec des concentrations prédéterminées de l'analyte ciblé. Cela conduit aux courbes d'étalonnage. La linéarité des tracés d'étalonnage est une mesure de la précision du test. Le coefficient de corrélation au carré (R^2) de ces courbes fournit un modèle statistique pour étudier la précision du test . Le R^2 est compris entre 0 et 1. Lorsque R^2 a la valeur la plus proche de 1, le tracé est à sa linéarité la plus élevée et le test est donc à son meilleur niveau de précision. L'analyse de l'étalonnage est l'une des étapes essentielles de l'évaluation du test car elle révèle la fiabilité du test (Riffelmann M et al ., 2010)

20.. Source d'erreurs

Lors de la réalisation d'un test ELISA, l'une des sources d'erreurs les plus courantes peut être l'incohérence du matériel utilisé, comme le type et la marque des plaques à puits, des pipettes, des embouts de pipettes, ainsi que des produits chimiques et des réactifs utilisés pour la préparation des tampons. En particulier, lorsque les résultats de chaque test doivent être comparés avec ceux du test précédent ou du test suivant il est très important de suivre exactement le même protocole et d'utiliser les mêmes outils pour réaliser le test.

Une autre source d'erreur réside dans une quantité excessive d'analyte dans l'échantillon pour laquelle les dilutions en série peuvent conduire à une concentration inexacte de l'analyte et à des résultats trompeurs (Terato K et al., 2016) . Il existe également d'autres considérations pour mener à bien un test.

Les principaux problèmes sont rencontrés lorsque des échantillons de sérum réels contenant plusieurs protéines sont testés. Même lorsque le couplage est spécifique, des contaminants ou d'autres biomolécules similaires à l'analyte cible pourraient également entrer

en compétition et se lier à chaque contrepartie ou même à la surface solide, donnant lieu à des signaux faux négatifs ou faux positifs.

Ces faux signaux, connus sous le nom de bruit de fond, peuvent même dépasser le signal de détection réel, en particulier lorsque des échantillons fortement dilués sont utilisés [1]. L'apparition de tels signaux de fond entraîne évidemment l'échec du test. Ce problème peut être résolu en utilisant des échantillons plus spécifiques tels que l'ELISA compétitif, le double sandwich ou L'ELISA en phase liquide [2-4]. Ces protocoles sont toutefois complexes, longs et fastidieux. La détermination de la densité optique (DO) de fond en l'absence de l'analyte d'intérêt est donc l'un des contrôles obligatoires de tout essai (**Terato K et al., 2016**)

Un signal de fond faussement positif en ELISA se produit généralement lorsque des protéines non spécifiques se lient à la phase solide ou à d'autres protéines. Des signaux faussement positifs pourraient également se produire en raison de l'inhibition directe ou compétitive de l'analyte cible par d'autres anticorps ou composants présents dans les tampons de blocage ou de dilution, ou par la dénaturation de ses épitopes par des détergents ioniques. La soustraction des valeurs de fond à partir des valeurs de DO est une étape de routine dans l'interprétation des données ELISA (**Kishimoto T et al ., 2009**)

20-1. Dépannage

Autre la liaison non spécifique et le bruit de fond, plusieurs erreurs peuvent survenir lors de la réalisation d'un test ELISA. Des lectures de signaux élevés ou faibles, un développement incomplet de la couleur, une mauvaise reproductibilité, une incohérence dans les lectures de contrôle et des courbes d'étalonnage non linéaires en sont quelques exemples. Il est donc utile de (**Crowther JR ., 2009**) :

- Rédiger l'ensemble du protocole personnalisé et les déviations avant de le réaliser l'essai.
- Étiqueter et disposer les échantillons, les tampons, les plaques à puits, etc., et avoir une cartographie claire de l'expérience à l'avance. Développez des compétences de pipetage et une bonne concentration sur l'essai.
- Vérifiez soigneusement les équipements tels que les incubateurs, les réfrigérateurs et les machines de lecture avant de planifier un essai. Les pipettes doivent également être calibrées régulièrement.

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

1-Lieu d'étude

L'étude a été menée au niveau du centre de référence de prise en charge d'infection VIH (CDR) situé à l'hôpital Mohamed Boudiaf au niveau de wilaya d'Ouargla, ce centre a été ouvert au 24 mars 2020, mais le début de diagnostique sérologie en septembre 2020.

2-Présentation du centre :

Le centre se compose de :

- Deux bureaux de consultation pour deux médecins des maladies infectieuses.
- Une salle d'archive
- Une pièce d'accueil et de secrétariat.
- Une salle d'attente femme / homme.
- Une pharmacie pour délabrée.
- Un bureau pour le chef service.
- Un bureau pour les biologistes.
- Une salle de prélèvement.
- Un laboratoire pour diagnostique
- un paillasse de FNS, biochimie, bilan d'hémostase et ionogramme
- Un bureau pour psychologue.

3-Type et période d'étude

Il s'agit d'une étude rétrospective, descriptive d'ordre de diagnostic. L'étude sérologique est déroulée de 28 février 2021 à 29 avril 2021, et l'étude diagnostic sérologie a porté sur les données diagnostic du VIH/SIDA par la techniques ELISA de la période de 1 Juin 2020 à 1 mai 2021 au niveau de l'hôpital de Mohamed Boudiaf de la wilaya de Ouargla.

4-Population d'étude

4-1.Les critères d'inclusion

Sont inclus dans cette étude de diagnostic sérologie tous les adultes dont une sérologie VIH a été demandée.

4-2.Critères d'exclusion

- Coïnfection à VIH
- Les enfants et nourrissons moins de 18 mois.

5-Les supports des données

- Les bases de cette étude sont les registres de recensement et les dossiers médicaux des malades.
- Les paramètres étudiés sont : le sexe, l'âge.
- Les graphiques ont été faites à partir SPSS.

6-Les aspects éthiques

L'accord du directeur de l'hôpital de Mohamed Boudiaf de la wilaya d'Ouargla, et le chef service de CDR.

Le relevé des résultats sérologie du VIH a partir des bases de données de laboratoire a été faite dans le respect de l'anonymat des patients et de la confidentialité de leurs données.

7- Épipiquiment du test

- Gants à usage unique et les embouts
- Micropipette réglable 0 à 100 μ l
- Chronomètre
- Centrifugation
- Spectrophotomètre
- Incubateur
- Appareil de distribution et d'aspiration de solution de lavage
- Eau de javel
- Trousse de réactifs genscreen HIV 1+2 ANTIBODY ELISA KIT
- Réfrigérateur
- filme adhésif
- Echantillon (sérum ou plasma)

8-Composition de la trousse

- Microplaque de 96 puits
- Solution de lavage et _Contrôle positif
- Contrôle négatif
- Chromogène A
- Chromogène B
- Conjugué HRP
- Solution de stop

9-Principe du test utilisé

Ce test ELISA anti-VIH 1+2 est un kit d'immuno-essai enzymatique "sandwich" à incubation en deux étapes, qui utilise des barrettes de micro puits en polystyrène pré-revêtues d'antigènes recombinants du VIH exprimés dans *E.coli* (gp41, gp120 recombinants du VIH-1, et gp-36 recombinants du VIH-2). L'échantillon de sérum ou de plasma du patient est ajouté, et pendant la première étape d'incubation, les anticorps spécifiques du VIH-1/2 seront capturés à l'intérieur des puits s'ils sont présents. Les micros puits sont ensuite lavés pour éliminer les protéines sériques non liées.

Une deuxième série d'antigènes recombinants conjugués à l'enzyme peroxydase de raifort (HRP-conjugué) et exprimant les mêmes épitopes que les antigènes pré-enrobés est ajoutée, et pendant la deuxième incubation, ils se lieront à l'anticorps capturé.

Les micros puits sont lavés pour éliminer le conjugué non lié, et des solutions de chromogène sont ajoutées dans les puits. Dans les puits contenant l'immuno-complexe "sandwich" antigène-anticorps-antigène (HRP), les chromogènes incolores sont hydrolysés par le conjugué HRP lié en un produit de couleur bleue. La couleur bleue vire au jaune après l'arrêt de la réaction avec de l'acide sulfurique. L'intensité de la couleur peut être mesurée et elle est proportionnelle à la quantité d'anticorps capturée dans les puits, et à l'échantillon respectivement. Les puits contenant des échantillons négatifs pour l'anti-VIH 1/2 restent incolores.

10-Méthode

Le sang est collecté dans des tubes résistants à la centrifugation qui sont ensuite placés dans un EDTA ou autre tube, après la décantation sanguine, les échantillons sont défibrés et centrifugés à 3000 tours pendant 5 minutes, le sérum ou Plasma obtenu est ensuite transféré dans une microplaque de 96 puits.

Les sérums ou plasma sont conservés soit au réfrigérateur (2 à 8 C°) jusqu'à cinq jours, et ils restent stables pendant deux mois en étant congelés (-70 C°).



Figure 34. L'appareil de la centrifugation et les tubes centrifugées.

Une plaque de 96 puits (alvéolaire) est généralement utilisée pour tester un grand nombre D'échantillons simultanément, au fond de ces puits des antigènes viraux sont fixé, Pour ce dépistage, le kit de test utilisé était HIV 1+2 ANTIBODY ELISA KIT.



Figure35. Kit ELISA pour la diagnostiques de VIH

Il faut suivre strictement le protocole proposé.

- 1- Préparer le nombre nécessaire de puits, y compris un puits pour les blancs , deux puits pour le contrôle négatif, un puits pour contrôle positif (sont utilisés pour s'assure de la fiabilité du matériel) et un puits pour chaque échantillon.

Matériel et méthodes



Figure 36. Préparation de la microplaque.

2-ajouter 100 μ l de contrôle positif, de contrôle négatif à chaque puits appropriés et d'échantillon dans leurs puits respectifs, à l'exception du blanc

Remarque

Utilise un embout de pipette séparé pour chaque échantillon, control négatif, contrôle positif éviter la contamination croisée.

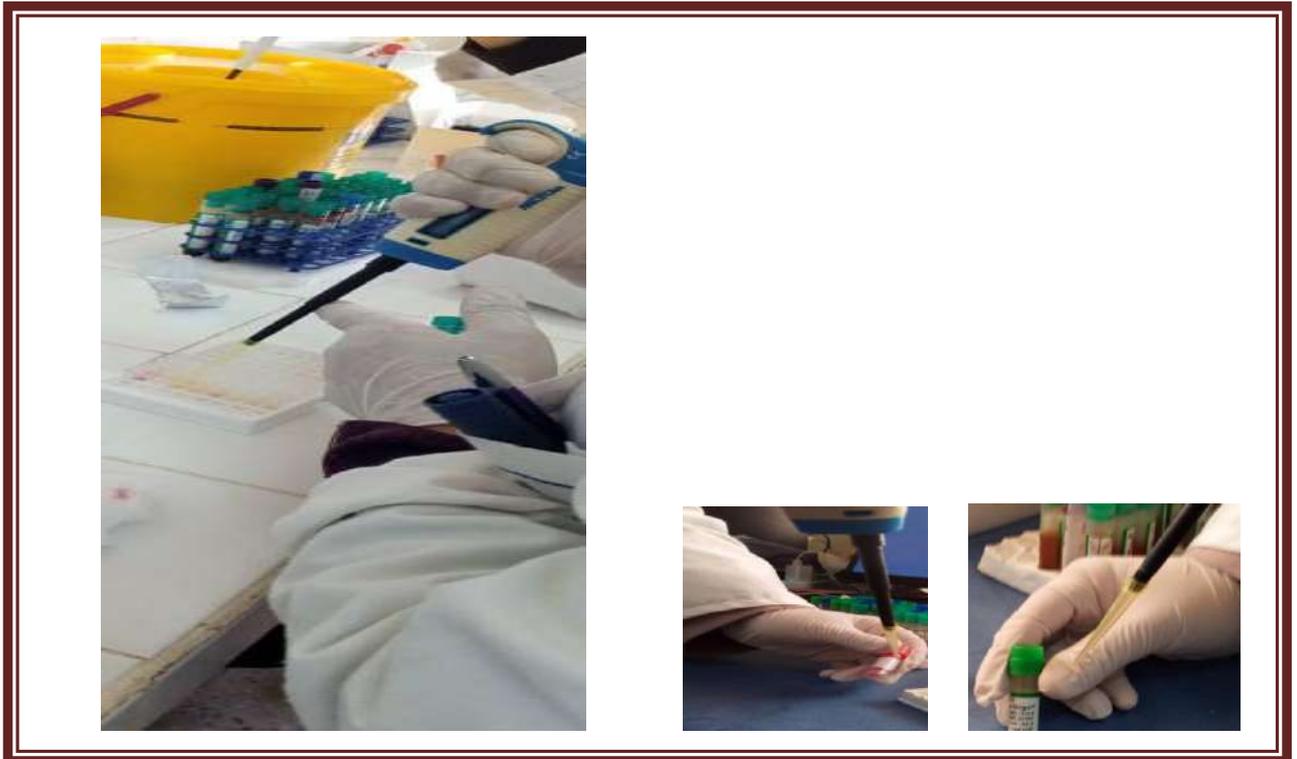


Figure 37. Distribution de contrôle négative et positive et échantillons.

3-couvrir la microplaque par film adhésif en appuyant bien sur les bords pour assurer l'échanchéité.



Figure 38. La microplaque couverte. (Après l'ajoute d'échantillon)

4-incuber la microplaque dans un incubateur sec de microplaque pendant 30 minutes à 37 C°.



Figure 39. L'incubateur de la microplaque et la microplaque.

Matériel et méthodes

5-à la fin de l'incubation, retirez et jetez le couvercle de la plaque. Lavez chaque puits pendant 5 minutes avec un tampon de lavage dilué. à chaque fois, laissez les micro puits s'immerger pendant 30 à 60 secondes. Après le dernier cycle de lavage, posez la plaque sur du papier buvard ou une serviette propre et tapotez-la pour éliminer tout résidu.



Figure 40. La microplaque dans un appareil de lavage.

6-Distribuer 100 μ l de conjuguée HRP dans chaque puits, sauf le blanc.

Remarque

La conjuguée est un antigène couplée par enzyme appelé peroxydase



Figure 41. La distribution de conjuguées dans la microplaque.

Matériel et méthodes

7 – recouvrir la microplaque par un film adhésif et incuber dans un incubateur de la microplaque pendant 30 minutes à 37 C°.



Figure 42. la microplaque couverte (après l'ajoute de conjuguées) et incubateur.

8_ à la fin de l'incubation, retirez et jetez le couvercle de la plaque. Lavez chaque puits pendant 5 minutes avec un tampon de lavage dilué. à chaque fois, laissez les micro puits s'immerger pendant 30 à 60 secondes. Après le dernier cycle de lavage, posez la plaque sur du papier buvard ou une serviette propre et tapotez-la pour éliminer tout résidu.

9_ ajouter 50 μ l de solution de chromogène A et 50 μ l de solution de chromogène B dans chaque puits y compris le blanc.



Figure 43. La distribution de la solution de chromogène A et chromogène B dans la microplaque.

Matériel et méthodes

10- incuber la plaque à 37 C° Cependant 15 minutes en évitant la lumière, la réaction enzymatique entre la solution de chromogène et le conjugué HRP produit une couleur bleue dans les puits d'échantillon positif.



Figure 44. Après l'incubation et lavage deux solution de chromogène.

11_ à l'aide d'une pipette, ajouter 50 μ l de solution d'arrêt dans chaque puits.

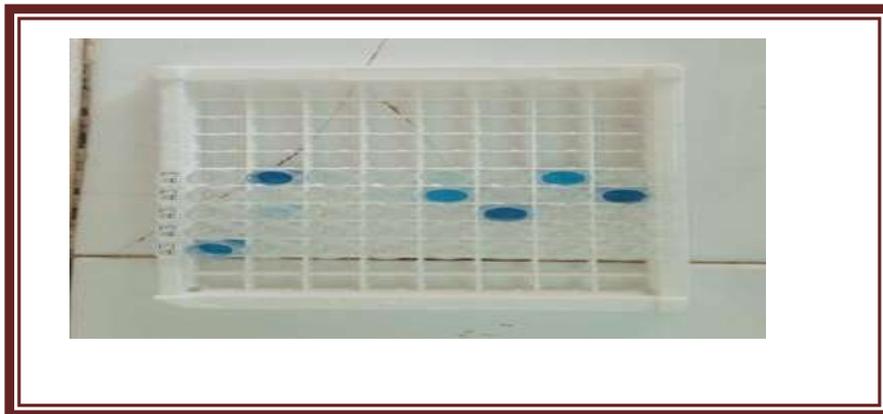


Figure45. L'ajoute de solution de stop dans la microplaque.

12- lire la densité optique à 450 nm à l'aïd d'un lecteur de plaque appelle spectrophotomètre.



Figure 46. L'appareil de lecture de la microplaque.

11-Limitations du test utilisé

- ✓ Les résultats positifs doivent être confirmés par une autre méthode disponible et interprétés en conjonction avec les informations cliniques du patient.
- ✓ Les anticorps peuvent être indétectables au stade précoce de la maladie et chez certains individus immunodéprimés. Par conséquent, les résultats négatifs obtenus avec ce test ELISA anti-VIH 1+2 indiquent seulement que l'échantillon ne contient pas de niveau détectable d'anticorps anti-VIH 1/2 et tout résultat négatif ne doit pas être considéré comme une preuve concluante que l'individu n'est pas infecté par le VIH 1/2 ou que l'unité de sang n'est pas infectée par le VIH 1/2.
- ✓ Si, après un nouveau test des échantillons initialement réactifs, les résultats du test sont négatifs, ces échantillons doivent être considérés comme non reproductibles (faux positifs) et interprétés comme négatifs. Comme pour de nombreux tests ELISA très sensibles, des résultats faussement positifs peuvent se produire pour plusieurs raisons, dont la plupart sont liées, mais non limitées, à une étape de lavage inadéquate.
- ✓ Les erreurs de dosage les plus courantes sont l'utilisation de kits au-delà de la date de péremption, de mauvaises procédures de lavage, des réactifs contaminés, des étapes de procédure de dosage incorrectes, une aspiration insuffisante pendant le lavage, une chute des échantillons hautement hémolysés ou des échantillons contenant de la fibrine, des échantillons de sérum incomplètement coagulés.
- ✓ La prévalence du marqueur affectera les valeurs prédictives du dosage

Matériel et méthodes

- ✓ Ce test ne peut pas être utilisé pour tester un pool de plasma mixte. cet anti VIH 1.2 ELISA a été évalué uniquement avec des échantillons individuels de sérum ou de plasma
- ✓ Cet anti VIH 1,2 ELISA est un test qualitatif et les résultats ne peuvent pas être utilisés pour mesurer la concentration d'anticorps. ce test ne permet pas de distinguer les infections par le VIH 1 /2

Résultats et discussion

1-Résultats

1-1.Résultats de l'étude sérologique :

Technique d'ELISA SANDWICH

L'intensité de la coloration (**figure 47**) est proportionnel à la quantité d'enzyme présente et donc à la concentration d'anticorps recherchés (Ac Anti-VIH) ; mais l'examen visuel de la coloration des puits doit être soutenu par la mesure de la densité optique de chaque échantillon et la valeur Cutt-off pour une interprétation précise des résultats

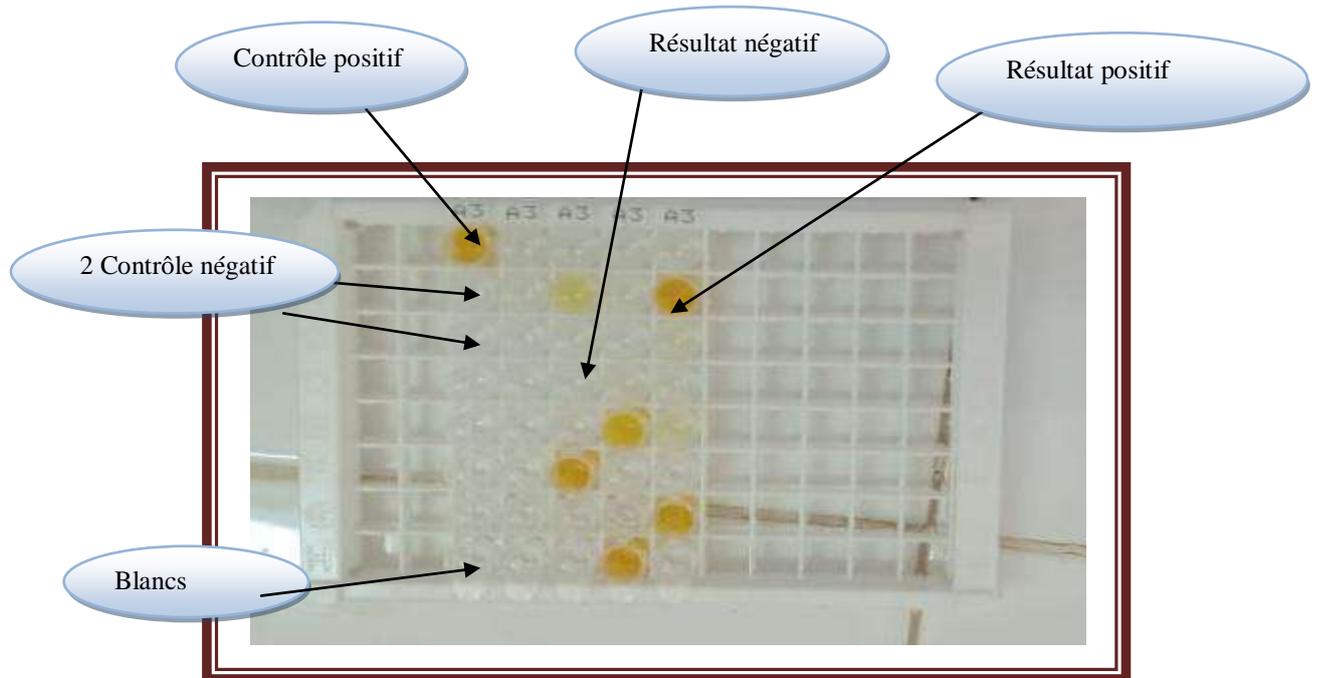


Figure 47. Résultat du test ELISA

Calcul de valeur Cutt-off ;

- $\text{Cutt-off} = 0,12 \times \text{NC}$
- $\text{NC} = \frac{\text{NC1} + \text{NC2} + \text{NC3}}{3}$
- NC c'est la valeur moyenne de l'absorbance de trois contrôles négatifs

Interprétation des résultats ;

- Les échantillons dont les valeurs d'absorbance sont supérieures ou égales 0,080 à 450/630 nm à la valeur de Cutt-off sont considérés comme positifs.
- Les échantillons dont l'absorbance est inférieure 0,080 à 450/630 nm à la valeur de Cutt-off sont considérés comme négatifs.

Résultats et discussion

- Les échantillons positifs doit être confirmé par un d'autre test appelé western blot.

1-2. Résultats de l'étude épidémiologique :

Les résultats obtenus après l'analyse des différents paramètres sont présent dans les tableaux et les graphies ;

1-2-1.Réparation selon le sexe

Les hommes représentaient 48%des patients par contre les femmes représentaient 52% des patients (**Tableau 15**) , la sex-ratio F/M de 1.08(**L'annexe IV, figure 1**)

Tableau 15 : Réparation selon le sexe

SEXE	Fréquence	Pourcentage
Masculin	109	48.2
Féminin	117	51.8
Total	226	100.0

1-2-2.Selon la tranche d'âge

La répartition des malades en fonction des différentes tranches d'âge observées a été illustrée et représentée par (**L'annexe IV, figure2**), montre une prédominance des tranches d'âge de 35 à 44 ans et de 25 à 34 ans. Elles correspondaient respectivement à 43,3% et à 26,1% de la population étudiée (**Tableau 2**).

Tableau 3.Réparation des personnes nouvellement infectés avec le VIH selon tranche d'âge

Tranche d'Age	Effectif	Pourcentage
Moins de 15	3	1.3 %
15-24 ans	18	8.0 %
25-34 ans	59	26.1 %
35-44 ans	99	43.8 %

Résultats et discussion

45-54 ans	30	13.3 %
55-64 ans	15	6.6 %
65 et plus ans	2	0.9 %
Total	226	100.0 %

1-3 .Discussion

- Sur une période d'étude, nous avons effectué une étude rétrospective descriptive au niveau de centre de référence de prise en charge d'infection VIH afin de Décrire Le profile épidémiologie d'infection VIH/SIDA' durent de période d'étude. Épidémiologiques de l'infection à VIH / SIDA au niveau de la wilaya de Ouargla.

Le test utilisé au cours de notre étude était : HIV 1+2 ANTIBODY ELISA KIT

- **Répartition selon le sexe**

Le nombre des femmes nouvellement atteints de VIH dans notre série représentait 52% des cas, tandis que la part des hommes représentait 48% .Selon l'ONUSIDA (2017), ces chiffres ne sont pas concordants avec ceux que publiés en Algérie (379 homme et 344 femme). La fréquence élevée chez les femmes pouvait se traduire par la sexualité précoce, et anatomique de la femme (réceptivité de la femme, fragilité de la muqueuse vaginale), le mariage aux hommes beaucoup plus âgés qu'elles, elle serait probablement en rapport avec la vulnérabilité socio-économique (pauvreté et sous-emploi).

Selon les données du LNR ; en concernant genre il y a une tendance à la féminisation au cours de la dernière décennie : si en 2000 , l'infection étaient plus fréquente chez homme que chez les femme , ces dernières années, l'infection touche aussi bien la femme que l'homme de façon équitable .Ceci qui conforte le mode de transmission hétérosexuel de l'infection en Algérie (**Plan national stratégiques de lute contre les IST VIH SIDA., 2020-2024**)

- **Répartition selon tranche d'âge**

Les personnes vivant avec le VIH dont l'âge est compris entre 35 -44 ans étaient les plus représentées avec 43,8% dans notre étude, suivie par celle de 25-35 ans.

Selon ONUSIDA en 2017 nos résultats sont en accord avec ceux que rapportés, qui affirme que les tranches les plus touchées en Algérie étaient celle de groupe des 30 à 34 ans, cette prédominance d'adulte jeunes semble être en rapport avec leur vie sexuelle active et la tranche d'âge la plus mature et le chaumage.

Résultats et discussion

Ces résultats sont similaires selon du LNR qui montrent une incidence spécifique par âge plus élevée chez les 20-54 ans (**Plan national stratégiques de lutte contre les IST VIH SIDA., 2020-2024**)

Conclusion

Conclusion

La wilaya d'Ouargla reste une zone épidémiques de VIH à cause de ces caractères socio-économiques et géographiques : pole économique (bases de vie de Hassi Messaoud), localisation géographiques (une plaque tournante de la contrebande avec les pays frontaliers (Mali, Niger et Libye)), prédominance de la population jeune avec problèmes de chômage .Tous ces éléments constituent des facteurs pouvant favoriser l'émergence de comportements à risques tels que le travail de sexe et l'usage de drogues.

Le dépistage de l'infection VIH à un stade précoce constituée l'élément clé pour lutter contre la dissémination de cette maladie.

Nous avons rappelé l'intérêt de la technique ELISA qui permet d'allier la spécificité de réaction antigène –anticorps à la sensibilité d'une réaction enzymatique qui amplifie les résultats.

Notre étude rétrospectif et descriptif entre le 01 juin 2020 au 01 mai 2021 au Niveau de centre de référence de prise en charge d'infection VIH (CDR) de la wilaya du Ouargla, nous a permet d'étudier la place de test ELISA dans le diagnostic sérologique de VIH et de décrire le profil épidémiologie de l'infection VIH/SIDA durant la période d'étude.

Dans cette étude nous avons abouti aux résultats suivants :

- Les deux sexes ont été concernés par l'infection avec une prédominance sexe féminin 52% Par contre les sexes masculins représentés 48%.
- Le tranche d'âge 35 – 44 ans a été la plus touchée avec 43,8%.

Compte tenu de nos résultats obtenus et dans la perspective de l'étude diagnostiques sérologie de VIH par techniques ELISA, on propose

- ✓ Le choix des professionnelles qualifiées.
- ✓ Un bon équipement pour une meilleur réalisation dut est ELISA
- ✓ La disponibilité des moyennes de protection
- ✓ L'amélioration de la qualité des antigènes et aussi l'unification de la procédure des calibrations entre les différentes firmes

Référence
bibliographiques

Références bibliographiques

Ajioka JW, Soldati D. Toxoplasma: Molecular and Cellular Biology. Horizon Scientific Press; 2007. 649 p

Agut H, Seigneurin JM. Taxonomie et nomenclature des virus: l'esprit de famille. *Viral.* 1994; 4: 14 -9.

Alizon I, Clavel F. Les VIH: de leur découverte à leur analyse moléculaire. In: Montagnier. L, Rozenbaum W, Glukman. JC. *Le sida et l'infection par le VIH: 1989:91-110.*

ADIKO E ,2013 : Evaluation du test GENIE III R HIV-1 /HIV-2 de bio –rad pour le dépistage de l'infection VIH en cote d'ivoire p 19 ,20, 22, 58,25 .24.

Agut H, Boutolleau D, Burrel S. Diagnostic virologique. EMC-Maladies infectieuses, 2014;11:1-8

Akintude ME, Heuer L, Van de Water J (2013). Immune abnormalities and autism spectrum disorders. Elsevier Inc., *The Neuroscience of Autism Spectrum Disorders*

Aria L, Acosta ME, Guillen Y, Rojas A, Meza T, Infanzón B (2016). ELISA Chagas test IICS V. 1 evaluation for the diagnosis of Chagas disease. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud* 14:7-13

Armbruster DA, Pry T (2008) Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin Biochem Rev* 29-S49

Asensio L, González I, Garcia T, Martin R (2008). Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control* 19:1-8

Association Canadienne de Normalisation. Norme nationale du Canada. Laboratoire d'analyses de biologie médicale – Exigences particulières concernant la qualité et la compétence, CAN/CSA-Z15189-03, première édition, septembre 2003.-2004.

Avrameas S, Uriel J (1966). Méthode de marquage d'antigènes et d'anticorps avec des enzymes et son application en immunodiffusion. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*262:2543-2545

Avrameas S (1969). Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde: use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry* 6:43IN919-48IN1152

Barré -Sinoussi F, Cherman JC, Rey F, Nugeyre-Chamaret S, Gruet J, Dauget C, Axler Blin C, Brun-Vezinet F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. Isolation of a T lymphotropic retrovirus from a patient at risk of acquired immunodeficiency syndrome. *Science.*1983; 220: 868-71

.BARRE-SINOUSSE F., CHERMANN J.C., REY F. et al. Isolation of a T.lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), *Science* 1983, 220, 868-871.

Brun - Vezinet F, Simon F, Saragosti S. Variability of human immunodeficiency virus type 1 group O strains isolated from Cameroonian patients living in France. *J Virol.*1995; 69(9):5640-49

Brun-Vézinet F, Wainberg M. HIV : structure, multiplication et physiopathologie. In: Hureau JM, Nicolas JC, Agut H, Peigue-Lafeuille H. *Traité de virologie. ESTEM 2003*:319-29. *nales du diagnostic biologique de l'infection VIH . 2013*

Carte du monde avec les recombina génétiques.www.wikipedia 25/11/2009

Castagnaa, Danisea, Menzos E et al. Lamivudinemonotherapyin HIV-1-infectedpatientshar-bouringa lamivudine-resistantvirus : a randomizedpilot study (E-184Vstudy)[inprocesscitation].*AIDS*,2006,20:795303.[mentaire_depistage_vih_volet_2_vfv_2009-10-21_16-49-13_375.pdf](#)

Collumbien M ,Qureshi AA ,Mayhew SH ,Riwvi N ,Rabbani A ,Rolfe B et al . Understanding the context of male and trans –generd sex work using peer ethnography .*Sex transm infect* 2009 ; 85(suppl 2) : ii3-ii7

Chabrolle D. et Agut H . Diagnostic biologique de l'infection VIH M. ROSENHEIM et ITOUA – NGAPORO SIDA- infection VIH , aspect en zone tropicale CH1 – P36- 46 Edition Ellipses/Aupelf Paris 1989

Chamaret S. Encore un nouveau Retrovirus VIH-1 identifié. *Transcriptase sud* 1999;1:28-30

Champagne P, Ogg GS, King AS, Knabenhans C, Ellefsen K, Nobile M, et al. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature.* 2001;410(6824):106-11. Epub 2001/03/1091.

Chuaire L, Cediel JF (2008). Paul ehrlich: from magic bullets to chemotherapy. *Colombia Médica* 39:291 295

Clinical and Laboratory Standards Institute. Procedures and Devices for the Collection of Diagnostic Capillary Blood Specimens, Approved Standard, Sixth Edition, Pennsylvania, CLSI, H4-A6, 2008.

Christine Rouzioux ML, h.h.a.JM, Nicolas JC, Peigue-Lafeile H, *Epidemiologie et dianostic du VIH, Traité de virologie médicale* editon estem, 2003

Crowther JR (2009) *The ELISA guidebook.* Springer. ISBN 978-1-60327-254-4

Darlix JC, Roques BP. La nucléocapside du virus humain HIVI. *Med. Sci.* 1993;9(8-9):952-8.

Davies DR, Chacko S (1993). Antibody structure. *Acc Chem Res* 26:421 427

Deeks SG, Walker BD. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity.* 2007;27(3):406-16. Epub 2007/09/26.

Defranco AL, Robertson M, et Locksley RM. Immunité: la réponse immunitaire dans les maladies infectieuses et inflammatoires. De boeck supérieur, Bruxelles. 2009.400 pages. ISBN :978-2-8041-5957-3.

Delfraissy J-F. Mécanismes immunologiques et virologiques impliqués dans l'infection à VIH: impact des traitements. La revue du praticien 1999; 49: 1740-1751.

Denis F, M'boup S, Sangare A, Leonard G, Verdier A, Ranger S. Les virus de l'immunodéficience humaine:

Structure, organisation génétique, réplication. In: SIDA, infection à VIH, aspects en zone tropicale. Rosenheim M et Ngaporo IM. Ellipses Paris. 1989:12-32

Dgisselqist, R Rothenbreg , J Potterat , E Drcker . La transmission non sexuelle du VIH passée sous silence. BMJ 2002 ; (324) =235.

DGPPS. 2013.Plan national stratégique de lutte contre les IST/VIH/SIDA. Edition ANDS, p. 13

Eminiea , Koff WC. Developing an AIDS vaccine: Need, uncertainty, hope. Science.2004, 304:1913-1914 Encarta, Ed 2004.

Ernest Derneville, Line Arnould. Traitement et prévention des Infections opportunistes. IMT 2004. Lut lynen ;(124):12-15Extrait du Biotechnologie & Biologie et Physiopathologie humaine - Académie de Rouen <http://biotech.spip.ac-rouen.fr/spip.php?article145>

Elrashied S .Draft Report :Generating strategic information and assessing HIV/AIDS Knowledge , Attitude and Behviour and practices as well as prevalence of HIV 1 among MSM in khartoum state , 2005 . Khartoum ;2006

El-sayed N, Abdallah M , Abdel Mobdy A , Abdel Mobdy A , Abdel Sattar A ,Aoun E ,Beths F ,et al .Evaluation of selected Reproductive Health infection in various Egyptian Population Groups in Greater Cairo . MOHP,IMPACT / FHI/UASID ;2002.

Elrashied S . Prevalence ,knowledge and related risky sexual behaviours of HIV /AIDS among receptive men who have sex with men (MSM) in Khartoum State ,Sudan,2005.Abstract TUPE 0509 .

Estimation Spectrum ONUSIDA ., 2018

Fagraeus A ; 1948. The plasma cellular reaction and its relation to the formation of antibodies in vitro. J Immunol 58:1-13.

Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoj B, Butto S; 2010. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. Annali dell'Istituto superiore di sanita; 46:5-14.

Fauci A; 1996. Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. Nature 384, 529-534. 13.

Fischer E ; 1894. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. II. Eur J Inorg Chem 27:3479-3183.

Fisher, J., Arnold, J.R.P ;2001 L'essentiel en Chimie pour Biologistes. Berti Editions, Paris COMPETITION.

For R. A. Goldsby, T. J. Kindt, B. A. Osborne et J Kuby ; 2003 . « Enzyme-Linked Immunosorbent Assay », in *Immunology*, 5^e édition, pages 148-150, W. H. Freeman, New York.

Fred the Oyster ; 2014. Antibody chains.svg [Image]. [Consulté le 01 juin 2021]. Disponible à l'adresse: < https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Antibody_chains.svg>

Gaudelus J. Tuberculosis in children. Rev Prat 2002 Dec 1; 52(19):2133-8

Gelderblom HR, özel M, Hausmann HS, Winkel T, Pauli G et Koch MA;1988 . Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV), immuno-location of structural proteins and virus-cell relation. *Micron and Microscopica*, 19:41-60.

Goff SP. Retroviridae. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM; 2013. Fields virology, 6th Ed. Philadelphia: Lippincott -Raven. Philadelphia Publishers,;1:1424-73.

Goonetilleke N, Liu MK, Salazar-Gonzalez JF, Ferrari G, Giorgi E, Ganusov VV, et al; 2009 . The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection. *J Exp Med*. 206(6):1253-72. Epub 2009/06/03

Gottlieb MS;1988 . Discovering AIDS. *Epidemiology*. 1988; 9:365–367Discovering AIDS. *Epidemiology*. 9:365–367.

Grammatikos AP, Tsokos GC ;2012. Immunodeficiency and autoimmunity: lessons from systemic lupus erythematosus. *Trends Mol Med* 18:101-108 .

Guide National de prise en charge therapeutiques de l'infection VIH /SIDA et des infection opportunités de l'adultte et de l'enfant 2021 .

Harries AD, Kumar AM, Kyaw N TT,Hoa NB, Takarinda KC, Zachariah R. ;2016. The role of antiretroviral therapy in reducing TB incidence and mortality in high HIV-TB burden countries. *Asian Pacific journal of tropical disease*. 6(3):243-7.

Harris LJ, Larson SB, Hasel KW, McPherson A ;1997 Relined structure of an intact IgG2a monoclonal antibody. *Biochemistry* 36:1581-1597. Image from the RCSB PDB (<http://www.rcsb.org>) of PDB ID 1IGT.

Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp P M.;2000. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science*. 287(5453):607-14

Haute Autorité de Santé. Dépistage de l'infection par le VIH en France. Stratégies et dispositif de dépistage. Recommandations en santé publique. Saint-Denis La Plaine: HAS; 2009.<http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2009-10/argu>

- Hodgkin PD, Heath WR, Baxter AG;2007.** The clonal selection theory: 50 years since the revolution. *Nat Immunol* 8:1019 -1026
- Ho D, Neumann A, Perelson A, Chen W, Leonard J, Markowitz M;1995.** Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373, 123-126.
- Hosseini S, Ibrahim F, Djordjevic I, Rothan HA, Yusof R, Cvd Marel et al ;2014.** Synthesis and characterization of methacrylic microspheres for biomolecular recognition: ultrasensitive biosensor for dengue virus detection. *Eur Polym J* 60:14-21
- Hosseini S, Azari P, Farahmand E, Gan SN, Rothan HA, Yusof R et al ;2015.** Polymethacrylate coated electrospun PHB fibers: an exquisite outlook for fabrication of paper-based biosensors. *Biosens Bioelectron* 69:257-264
- Hsu C-K, Huang H-Y, Chen W-R, Nishie W, Ujiie H, Natsuga K et al 2014.** Based ELISA for the detection of autoimmune antibodies in body fluid the case-- of bullous pemphigoid. *Anal Chem* 86:4605-4610 .
- Hunsperger EA, Yoksan S, Buchy P, Nguyen VC, Sekaran SD, Enria DA et al ;2014.** Evaluation of commercially available diagnostic tests for the detection of dengue virus NS1 antigen and anti-dengue virus IgM antibody. *PLoS Neglected Trop Dis* 8:e3171
- ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). ICTV Virus Taxonomy 2016 [Internet]. [le24 mars 2018]. Dispo**
- Inbar D, Hochman J, Givol D ;1972.** Localization of antibody-combining sites within the variable portions of heavy and light chains. *Proc Natl Acad Sci* 69:2659 2662 nible sur: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
- ISO, Organisation Internationale de Normalisation.** Laboratoire d'analyses de biologie médicale – Exigences particulières concernant la qualité et la compétence, Norme internationale, ISO 15189, Genève (Suisse), deuxième édition, 2007-0915.
- Ivens KO, Baumert JL, Taylor SL ;2016.** Commercial milk enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) kit reactivities to purified milk proteins and milk-derived ingredients. *J Food Sci* 81:T1871-T1878
- . Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik M ;2001.** Immunobiology, 5th edn. The Immune System in Health and Disease. New York: Garland Science 2001; ISBN-10: 0-8153-3642-X.
- Janlou Chaput ;2013.** Le test ELISA, célèbre méthode pour détecter le VIH. Futura santé [en ligne]. 02 juin 2013. [Consulté le 14 avril 2021]. Disponible à l'adresse: <https://www.futura-sciences.com/sante/dossiers/medecine-sida-vaincre-vih-1696/page/8/>
- Jordan MA, Baxter AG;2008.** Quantitative and qualitative approaches to GOD: the first 10 years of the clonal selection theory. *Immunol Cell Biol* 86:72.

Katlama C, Ghosn J ;2004. VIH et SIDA. Prise en charge et suivi du patient. Elsevier Masson;. 178 p. (Abrégés).

Karris M, Anderson C, Morris S, Smith D, Little S ;2012 . Cost savings associated with testing of antibodies, antigens, and nucleic acids for diagnosis of acute HIV infection. *J. Clin. Microbiol.*;50(6):1874-1878.

Khan OA , Hyder AA ; 1998 .HIV/AIDS among men who have sex with men in Pakistan .*Sex Health Exch:* 12-13 ,15.

Köhler G, Milstein C ;1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495 497

Lau JT , Tsui HY ,Siah PC ,Zhang KL;002 . A study on femal sex workers in southern China (Shenzhen) : HIV- related know-lerdge , condom use and STD history .*AIDS Care:* 14:219- 233

Lauricella MA, Maidana CG, Frias VF, Romagosa CM, Negriv, Benedetti R et al ;2016. An rK28-based immunoenzymatic assay for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in latin America. *Am J Trop Med Hyg* 95:92-98

Lekeehal N,2017 : co-infection tuberculose /VIH : aspects épidémiologiques et Clinique . These de doctura en pneumo-phtisiologie . universit deoran p52 .

Lemieux RU, SPOHR U ;1994. Concept for enzyme specificity 1. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 50:1 .

Leport C, Longuet P, Lacassin F, Vilde J L et al ;1996 . Manifestations cliniques et thérapeutiques de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine. *Encyl Med Chirur, Editions Scientifiques et Médicales, Elsevier, Paris, Maladies infectieuses, 8-050-B-10, 16p.*

Lequin RM ;2005. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem* 51:2415 2418 .

Le Sida dans l'UEEurstat, pressoffice@cec.en.intEurostat communiqué de presse, 139/2004.26 novembre 2004.

Lubong Sabado R, Kavanagh A,Kaufmann DE, Fru K, Babcock E, ROSENBERG E, et al ;2009. In vitro priming recapitulates in vivo HIV-1 specific T cell responses, revealing rapid loss of virus reactive CD4 T cells in acute HIV-1 infection. *PLoS One.* 2009;4(1):4256. Epub 01/24

Louise Favel ; 2017 . «Infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) en Tunisie : Profil socio-épidémiologique (1983 – 2016)», *Le Carnet de l'IRMC*, N° 21, novembre-mars.

Magines Frederick ;2008. La technique ELISA. *Biotechnologie [en ligne].* 08 avril 2021]. Disponible à l'adresse: <http://www.technobio.fr/article-18589062.html>

- Manifestations cliniques de l'infection par le VIH chez l'africain** : comparaison des cas observés en Afrique et en Europe. *Med- Trop.* 48N° Oct. 1998: 3-23
- Marrck JR ;1934.** The chemistry of antigens and antibodies. *J Phys Chem* 38-989.
- Marrack J, Carpenter BR ;1938.** The cross reactions of vegetable gums with type II antipneumococcal serum. *Br J Exp Pathol* 19:53 .
- Marrack JR ;1942.** Immunochemistry. *Annu Rev Biochem* 11:629 658 .
- Marseille M ;2018.** La prévention et le dépistage de l'infection par le VIH à l'Officine« PrEP »et autotests. Thèse de doctorat en pharmacie, Université de Marseille, 154.
- Marine M ;1994.** la prévention et dépistage de l'infection par le VIH l'officier autoteste .These du doctora universite de marseille p27.
- Mohammdi K ; 2017 :** technique de diagnostiques et marqueure pronostiques de l'infection HIV .These de doctora en microbiologie . Université d'alger p 19 ,58 .
- Montagnier L ;2008 .** « Le Virus de l'immunodéficience humaine ». *Rev. Prat.*, 1978, 37 : 2553- 2558Module de formation des pharmaciens privés sur la dispensation des ARV aux PVVIH. ARCAD/SIDA : Manuel du formateur.
- Montagnier LUC ;1932.***Encyclopædia Universalis* [en ligne], consulté le 25 juin 2021. URL : <https://www.universalis.fr/encyclopedie/luc-montagnier/>.
- Morrison S, Neuberger MS (2001)** Antigen recognition by B-cell and T-cell receptors. In: *Immunobiology: the immune system in health and disease*, 5th edn. Garland Science, New York.
- Mourez T, Simon F, Plantier JC ;2013 .** Non-M variants of human immunodeficiency virus type 1. *Clin MicrobiolRev*;26:448-61.
- Miles L, Hales C;1968.** Labelled antibodies and immunological assay systems. *Nature* 219:186-189 .
- Miura K, Orcutt AC, Muratova OV, Mille LH, Saul A, Long CA ;2008.** Development and characterization of a standardized ELISA including a reference serum on each plate to detect antibodies induced by experimental malaria vaccines. *Vaccine* 26:193-200 .
- Nandi S, Maity S, Bhunia SC, Saha MK (2014).** Comparative assessment of commercial ELISA Kits for detection of HIV in India. *BMC Res Notes* 7:436
- Patey O ,** Prise en charge en ville d'un patient infecté par le VIH (en dehors des traitements antirétroviraux) *Surveillances* 2001 P= 407-414.
- Pagon B., Peugeot-Lafeuille H.,** Infections sexuellement transmissibles : examens microbiologiques à faire et à ne plus faire. *Feuillets de biologie* 2011 ;303:7 -14

- Peeters M, Chaix ML, Delaporte E.** Phylogénie des SIV et des VIH. Mieux comprendre l'origine des. *Med Sci.* 2008; 24(6-7):621-8
- Peeters M, Delaporte E.** Diversité génétique de l'infection à VIH dans le monde, et ses conséquences *Médecine tropicale* 1999; 59. 4bis : 449-455.
- Person JM.** Le système immunitaire du chien. *Rec. Méd. Vét.*, 1978,154, 507-522
- Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, Oliveira F, Cordonnier F, Lemée V, Damond F, Robertson DL et Simon F,** « A new human immunodeficiency virus derived from gorillas [archive] », 2 août 2009, *Nature*. Mis en ligne le 2 août 2009, consulté le 3 août 2009
- Pichard E, Guindo A, Grossette G, Fofana Y I, Maiga, Koumaré B et coll.** L'infection par le VIH au Mali. *Med Trop* 1988, 48, 4: 345-349. p 345-349
- Pizza M, Scarlato V, Masignani V. Giuliani MM, Arico B, Comanducci M et al (2000).** Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science* 287:1816-1820
- Plan national strategique de lute contre les IST VIH SIDA 2020-2024**
- Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, et al.** A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* 2009;15:871-2
- Romieu I, Marlink R, Kanki P, M'Boup S, Essex M.** HIV-2 link to AIDS in West Africa. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 1990, 3(3):220-230
- Ruth E. McCall, Cathee M.** Tankersley. *Phlebotomy Essentials*. Fourth Edition, Lippincott Williams & Wilkins, USA, 2007
- Schieffelin J, Moses LM, Shaffer J, Goba A, Grant DS (2016).** Clinical validation trial of a diagnostic for Ebola Zaire antigen detection: design rationale and challenges to implementation. *Clinical Trials* 13:66-72
- Seelamgari A, Maddukuri A, Berro R et al.** Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. *Front Biosci.* 2004;9:2388-413.
- SIRANY K , 1993 .** incidence VIH residuel transfusionnel VIH chez les donneus des sang reguliers du C .N.T.S D'abidjan . Thses de doctora . Universiter du cote d'ivoire p15
- Shey MS, Maharaj N, Archary D, Ngcapu S, Garrett N, Abdool Karim S, et al.** Modulation of Female Genital Tract-Derived Dendritic Cell Migration and Activation in Response to Inflammatory Cytokines and Toll-Like Receptor Agonists. *PLoS One.* 2016;11(5):e1155668. Epub 2016/05/14
- Suhasini M et Reddy TR.** Cellular proteins and HIV-1 rev function. *Current HIV research.* 2009;7 (1):91-100

Tarigan S, Indriani R, Durr PA, Ignjatovic J (2015). Characterization of the M2e antibody response following highly pathogenic H5N1 avian influenza virus infection and reliability of M2 ELISA for identifying infected among vaccinated chickens. *Avian Pathol* 44:259-268

Taylor MW (2014). The history of immunology. viruses and man: a history of interactions. Springer, Berlin, pp 77-99

The Nobel Prize in Physiology or Medicine in 1972. Nobelprize.org. Nobel Media AB 2014. Web. 6 Sep 2017. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1972/

Theze J., Debre P. L'infection à VIH : aspects physiopathologiques et génétiques. In *Annales de l'Institut Pasteur / Actualités*, (J. Thèze and P. Debré, Eds, Elsevier Publisher), 2000

Terato K, DO CT, Cutler D, Waritani T. Shionoya H (2014). Preventing intense false positive and negative reactions attributed to the principle of ELISA to re-investigate antibody studies in autoimmune diseases. *J Immunol Methods* 407:15-25

Traore S. «Eude épidémiologique, clinique et économique des patients sidéens et des cas de SIDA/Tuberculose hospitalisés dans les trois hôpitaux de Bamako de juillet 1994 à Décembre 1994. Thèse Pharm Bamako FMPOS 1994.

Tunnicliffe DJ, Singh-Grewal D, Kim S, Craig JC, Tong A. Diagnosis, Monitoring, and Treatment of Systemic Lupus Erythematosus: A Systematic Review of Clinical Practice Guidelines. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2015 Oct;67(10):1440-52

Uchida K, Nakata K, Carey B, Chalk C, Suzuki T, Sakagami T et al (2014). Standardized serum GM-CSF autoantibody testing for the routine clinical diagnosis of autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *J Immunol Methods* 402:57-70

Vandepitte J , Lyerla R , Dallabetta G , Crabbe F , Alary M , Buve A . Estimates of the number of femal sex workers in differentregions of the world .*Sex Transm infect* 2006;82 (Supl 3) : ii18– ii25

Voller A , Bartlett A, Bidwell DE. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J Clin Pathol*. 1978 Jun 31(6):507-20.

Witebsky E (1954). Ehrlich's side chain theory in the light of present immunology. *Ann NY Acad Sci* 59:168-181

World Health Organization. Global tuberculosis report. 2015.

Welch RJ, Chang G-JJ, Litwin CM (2014). Comparison of a commercial dengue IgM capture ELISA with dengue antigen focus reduction microneutralization test and the Centers for Disease Control dengue IgM capture-ELISA. *J Virol Methods* 195:247-249

Yalow RS, Berson SA (1996). Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *Obesity* 4:583-600

Yang OO, Kalams SA, Trocha A, Cao H, Luster A, Johnson RP, Walker BD. 1997. Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by CD8+ cells: evidence for HLA class I-restricted triggering of cytolytic and noncytolytic mechanisms. *J Virol*

Youssoufif , 2019 : les facteurs génétiques de la variabilité interindividuelle de la réponse à l'infection par le VIH-1 : rol des gène du système HLA . These du doctora . Universite du maroco p17 ,74 ,57 ,58 .

.



Annexes

Annexes

Annexes I : Les matérielles utilisées dans ELISA



Les matériels et les réactives utilisées dans test ELISA

Annexes II : les appareils utilisés dans ELISA



**Appareil de
centrifugation**



Réfrigérateur



**Incubateur de
microplaque**



**Appareil de la lecture
de la microplaque
(spectrophotomètre)**



**Appareil de lavage de
la microplaque**

The results should be obtained by subtracting the Blank well A value from the net report values of specimens and controls to take the reading is based on dual plate reader do not subtract the Blank well A value from the net report values of specimens and controls.

Calculation of the Cut-off value (C.O.V.) is as follows:

Quality control (less variation): The test results are valid if the Quality Control results are within 2 standard deviations of the mean. It is recommended that each laboratory must establish appropriate quality control system with quality control material similar to or identical with the patient sample being analyzed.

The A value of the Blank well, which contains both Conjugated and Specimen, is 0.000 at 450 nm.

The A value of the Specimen well, which contains only Specimen, is 0.000 at 450 nm.

The A value of the Negative control A value does not meet the Quality Control criteria. It should be discarded and the mean value calculated again using the remaining two values. If more than one Negative control A values do not meet the Quality Control Range specifications, the test is invalid and must be repeated.

Example:

Blank well A value: $A = 0.000$ at 450nm (plate blanking is required only when reading with single filter at 450nm)				
Well No.:	B1	B2	B3	B4
Negative control A values after blanking:	0.010	0.012	0.016	0.018
Positive control A values after blanking:	2.421	2.421	2.395	2.421

Adjusted values are within the stated quality control range

2. Calculation of the Cut-off: $C.O.V. = 0.016 \times 1.96 = 0.316$

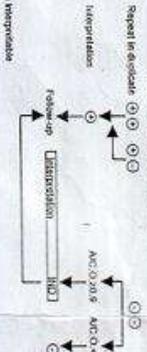
INTERPRETATIONS OF THE RESULTS

Negative Results ($A/C.O. < 1$): Specimens giving absorbance less than the Cut-off value are negative for the assay. It is important to note that HIV-1/2 antibodies have been shown to remain detectable to HIV-12 and should be considered in cases that other laboratory disease markers are also elevated.

Positive Results ($A/C.O. \geq 1$): Specimens giving an absorbance equal to or greater than the Cut-off value are considered indeterminate results, which indicates that anti-HIV-1/2 antibodies have recently been produced. The test should be repeated using the same specimen. Repeating the assay with specimens sent to a different laboratory for antibodies to HIV-1/2 with the anti-HIV-1/2 ELISA.

Borderline ($A/C.O. = 0.8-1$): Specimens with absorbance to Cut-off ratio between 0.8 and 1.5 are considered indeterminate and require a third specimen to determine if a third result is obtained.

INITIAL DATA IS INTERPRETATION AND FOLLOW UP ALL INDICALLY REACTIVE OR BORDERLINE SAMPLES



QND - Non Interpretation

1. After opening of the quality control samples, each with an assigned value (A/C.O. < 0.8), these samples should be considered as non-reportable results for false positive and reported as negative. As with many very sensitive ELISA assays, false positive results can occur due to the several reasons, most of which are connected with the order of the reagents and the quality of the reagents.
2. After checking of reagents, and quality of reagents, the final result from the ELISA test should be reported as negative. Repeating the assay with specimens could not be considered positive for antibodies to HIV-1/2 and therefore the patient is probably infected with HIV-1/2 and the result will not be discarded.
3. After reading in duplicate, samples with values close to the Cut-off value should be interpreted with caution and considered as "borderline" test results, or interpretation for the time being.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Extensive study carried in Albania, the Mediterranean, South-East and Southern Africa, demonstrated the following performance characteristics of the anti-HIV-1/2 ELISA. The diagnostic sensitivity of the kit was 99.63% as determined on all negative samples (5471) that were investigated. When evaluated on the uninfected donors only (1400) and false data (100), the specificity was 99.92% (926/926) (CI 95% 99.84-99.99).

Blind HIV-1/2 ELISA test results on uninfected donors:

Period	Number tested	Positive (A/C.O. ≥ 1)	Negative (A/C.O. < 1)
Row: serum donor	2024	2	2022
Row: system donor	1025	2	1023

Final test done:	949	1	0.10	868	91.50
Total	5471	4	0.08	5229	95.92

All panels of HIV-1, HIV-1 subtype O and HIV-2 confirmed antibody positive samples that were used in this study were also tested with the anti-HIV-1/2 ELISA with results in 100% sensitivity of 100%.

A total of 32 seronegative samples, which received 210 samples each, 13 samples not obtained from PRISMA and HIV-17 because there are not data of serology or RNA detection required for the confirmation, 41 samples considered as negative, RNA and/or serology negative 61 samples considered as seronegative, 59 samples considered as seronegative.

Type of sample	Number tested	Number	Positive (A/C.O. ≥ 1)	Negative (A/C.O. < 1)
seronegative	296	4	1.35	262
seropositive	101	0	0	101
Anti-HIV	4	0	0	4
Anti-HIV-2	5	0	0	5
Anti-HIV-1	4	0	0	4
Unknown IgG levels	5	0	0	5
Total	426	4	0.93	424

The specific study for typing specificity which were obtained:

- Positive samples were tested due to the interpretation of two-plate procedure.
- Positive samples were tested to check the interference due to collection and storage.
- Positive samples were tested to check the interference due to the use of the kit.

From laboratory specimens have been tested to check the interference due to collection and storage. The positive samples were tested to check the interference due to the use of the kit.

Specimens from patients with HIV-1/2 infection were tested to check the interference due to the use of the kit.

Prevalence of HIV-1/2 ELISA:

Duration	n	Average	% Positive	% Negative	Max. Detected	Min. Detected
120 days	20	3.00	1.50	4.50	1.70	1.80
60 days	10	3.70	5.32	10.10	4.57	15.69

LIMITATIONS

1. Positive results must be confirmed with another antibody method and interpreted in conjunction with the former clinical information.
2. Antibodies may be undetectable during the early stage of the disease and in some immunosuppressed individuals. Therefore, negative results obtained with the anti-HIV-1/2 ELISA are only indication that the specimen does not contain detectable level of antibody. It is not recommended to use the kit for the detection of HIV-1/2 in individuals with HIV-1/2.
3. If the retesting of the indeterminate samples, the assay results are negative, these samples should be considered as non-reportable (false positive) and interpreted as negative. As with many very sensitive ELISA assays, false positive results can occur due to the several reasons, most of which are connected with the order of the reagents and the quality of the reagents.
4. The most common assay mistakes are using kits beyond the expiry date, bad washing procedure, contaminated reagents, incorrect assay procedure steps, insufficient aspiration during mixing, failure to add the reagents in the correct order, and using the kit for the detection of HIV-1/2 in individuals with HIV-1/2.
5. The presence of the markers will affect the assay's predictive values.
6. This assay cannot be used for the detection of HIV-1/2 in individuals with HIV-1/2.
7. Only with individual serum or plasma specimens.
8. The assay cannot be used for the detection of HIV-1/2 in individuals with HIV-1/2.
9. The assay cannot distinguish between infections with HIV-1 and HIV-2.

REFERENCES

1. Bertschmann, J. et al. (1994) Isolation of a T lymphocyte reservoir from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science* 266: 869-871.
2. Bartsch, J. et al. (1994) Early detection of HIV-1 by a third generation enzyme immunoassay. *AIDS* 8: 141-144.
3. Anonymous (1994) WHO Collaborating Centre for the monitoring, surveillance and control of HIV/AIDS. *WHO Weekly Rep* 103: 1340-1344.

SUMMARY OF THE MAJOR COMPONENTS OF THE KIT
 This kit contains only a reference and always follow the comprehensive method sheet when performing the assay. Please be components of individual kits are not interchangeable.

SYMBOLS:

1. Microcentrifuge	Code 5
2. Negative Control (HIV-1)	504
3. Positive Control (HIV-2)	505
4. HIV-1/2	506
5. HIV-1/2	507
6. HIV-1/2	508
7. HIV-1/2	509
8. HIV-1/2	510
9. HIV-1/2	511
10. HIV-1/2	512

SUMMARY OF THE ASSAY PROCEDURE:
 Use the summary only as a reference and always follow the detailed method sheet when performing the assay.

EXAMPLES OF CONTROL/SAMPLES DISPENSING:

Well	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank											
B	Blank											
C	Blank											
D	Blank											
E	Blank											
F	Blank											
G	Blank											
H	Blank											
I	Blank											
J	Blank											

SYMBOLS:

- 1. Microcentrifuge
- 2. Negative Control (HIV-1)
- 3. Positive Control (HIV-2)
- 4. HIV-1/2
- 5. HIV-1/2
- 6. HIV-1/2
- 7. HIV-1/2
- 8. HIV-1/2
- 9. HIV-1/2
- 10. HIV-1/2
- 11. HIV-1/2
- 12. HIV-1/2

EXAMPLES OF CONTROL/SAMPLES DISPENSING:

Well	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank											
B	Blank											
C	Blank											
D	Blank											
E	Blank											
F	Blank											
G	Blank											
H	Blank											
I	Blank											
J	Blank											

SYMBOLS:

- 1. Microcentrifuge
- 2. Negative Control (HIV-1)
- 3. Positive Control (HIV-2)
- 4. HIV-1/2
- 5. HIV-1/2
- 6. HIV-1/2
- 7. HIV-1/2
- 8. HIV-1/2
- 9. HIV-1/2
- 10. HIV-1/2
- 11. HIV-1/2
- 12. HIV-1/2

EXAMPLES OF CONTROL/SAMPLES DISPENSING:

Well	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank											
B	Blank											
C	Blank											
D	Blank											
E	Blank											
F	Blank											
G	Blank											
H	Blank											
I	Blank											
J	Blank											

SYMBOLS:

- 1. Microcentrifuge
- 2. Negative Control (HIV-1)
- 3. Positive Control (HIV-2)
- 4. HIV-1/2
- 5. HIV-1/2
- 6. HIV-1/2
- 7. HIV-1/2
- 8. HIV-1/2
- 9. HIV-1/2
- 10. HIV-1/2
- 11. HIV-1/2
- 12. HIV-1/2

EXAMPLES OF CONTROL/SAMPLES DISPENSING:

Well	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank											
B	Blank											
C	Blank											
D	Blank											
E	Blank											
F	Blank											
G	Blank											
H	Blank											
I	Blank											
J	Blank											

SYMBOLS:

- 1. Microcentrifuge
- 2. Negative Control (HIV-1)
- 3. Positive Control (HIV-2)
- 4. HIV-1/2
- 5. HIV-1/2
- 6. HIV-1/2
- 7. HIV-1/2
- 8. HIV-1/2
- 9. HIV-1/2
- 10. HIV-1/2
- 11. HIV-1/2
- 12. HIV-1/2

EXAMPLES OF CONTROL/SAMPLES DISPENSING:

Well	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank											
B	Blank											
C	Blank											
D	Blank											
E	Blank											
F	Blank											
G	Blank											
H	Blank											
I	Blank											
J	Blank											

SYMBOLS:

- 1. Microcentrifuge
- 2. Negative Control (HIV-1)
- 3. Positive Control (HIV-2)
- 4. HIV-1/2
- 5. HIV-1/2
- 6. HIV-1/2
- 7. HIV-1/2
- 8. HIV-1/2
- 9. HIV-1/2
- 10. HIV-1/2
- 11. HIV-1/2
- 12. HIV-1/2

EXAMPLES OF CONTROL/SAMPLES DISPENSING:

Well	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank											
B	Blank											
C	Blank											
D	Blank											
E	Blank											
F	Blank											
G	Blank											
H	Blank											
I	Blank	Blank	Blank									

Annexes IV : Etude épidémiologie

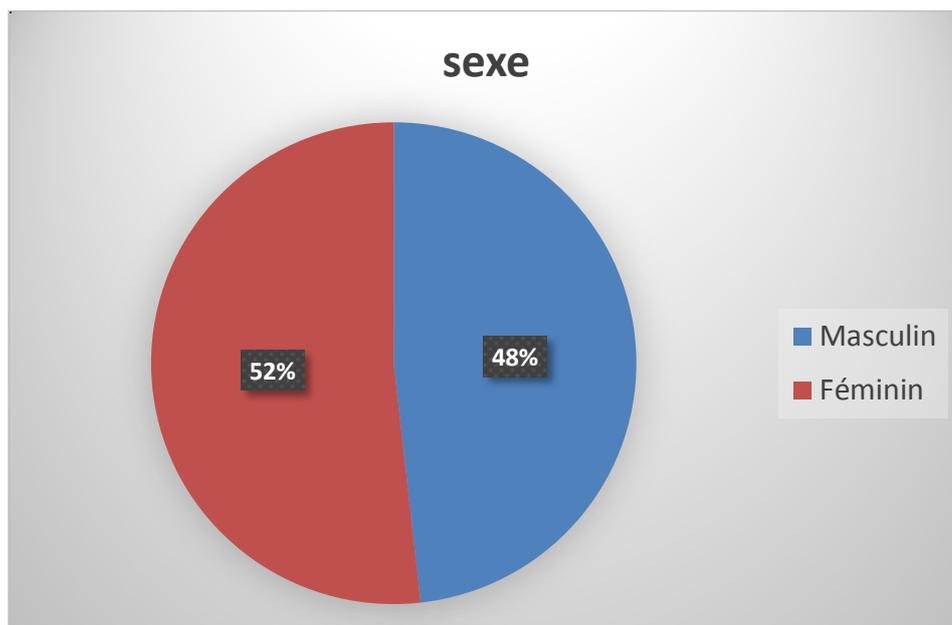


Figure1.. Répartition des personnes nouvellement infectés avec le VIH selon le sexe.

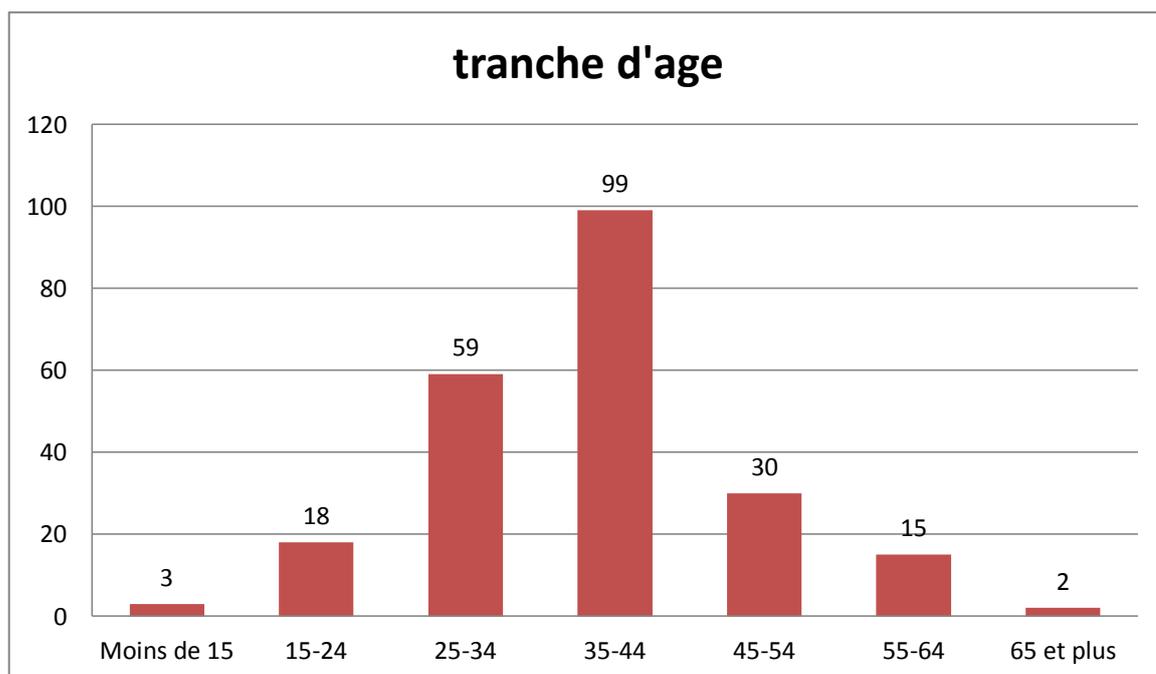


Figure 2 : répartition selon tranche d'âge des personnes nouvelles diagnostiquées

Annexes V : Les principaux agents pathogènes au cours du VIH /SIDA

Organisme	Bactéries	Virus	Parasites	Champignons
Habituellement opportunistes	Mycobactéries Atypiques	Cytomégalo virus	Pneumocystis carinii	Cryptococcus néofromans
			Cryptosporidium	
			Isospora belli	Candida Sp
			Microsporidium	
Habituellement pathogènes	Streptococcus pneumoniae	Herpès –Zona	Toxoplasma gondii Giardia intestinalis	Histoplasma Sp
	Salmonella Sp			
	Mycobactérium tuberculosis		Strongiloides stercaralis	
	Listeria Monocytogènes		Entamoeba histolytica	
	Haemophilus SP		Leishmania Sp	
	Rhodogoccus equi			
	Campylobacter			

Annexes VI : Dépannages

Raison possible	Solutions possibles
Signal de fond élevé	
La concentration de l'anticorps secondaire était très élevée	Diluez l'anticorps secondaire 10 fois ou plus
La plaque du puits n'était pas propre	Assurez-vous que les plaques à puits sont neuves et propres
Un réactif de blocage inapproprié a été utilisé	Suivez le protocole et utilisez les réactifs de blocage connus fraîchement préparés pour la préparation du tampon.
Il n'y a pas d'absorption d'antigène	Effectuer une adsorption pendant une nuit à 4°C
Incohérence dans les lectures à blanc	
L'incubation a été faite avec un tampon inapproprié	Assurez-vous que le tampon d'enrobage contient les bons composants
Plaque de puits séchée en raison de l'absence de milieu aqueux	Contrôlez le niveau de la solution à l'intérieur des puits pendant l'étape de fixation de l'analyte
Échec de l'essai	
Les tampons n'ont pas été décongelés correctement	Assurez-vous que les tampons sont à température ambiante avant de commencer l'essai
Les antigènes ne se sont pas liés aux puits	Modifier les conditions de liaison selon les instructions du fabricant
	Changez le tampon de dilution/enrobage en fonction du type de protéine et de la plaque à puits
	Avant le test proprement dit, effectuez un test de contrôle des protéines (tel que Bradford et l'acide bicinchoninique) afin de vous assurer l'enrobage
Certaines étapes de l'essai ont été	Suivez attentivement le protocole

omises	
Le lecteur de plaque a été réglé sur une longueur d'onde incorrecte	Vérifiez les réglages du filtre de l'instrument de lecture
Incohérence dans les résultats de lecture	
Les échantillons ont été préparés avec différents tampons	Utiliser les tampons fournis par le fabricant ou se référer à la méthodologie fournie
Tampons évaporés avant la lecture	Recouvrez la plaque d'une couche de plastique adhésif ou du couvercle lors de l'incubation
Les biomolécules ont été dénaturées	Utilisez un tampon PBS de pH ~ 7 comme tampon de lavage pour éviter la dénaturation. Évitez l'utilisation d'azide de sodium dans la préparation des tampons
Les échantillons n'étaient pas homogènes	Mélangez soigneusement les échantillons
Les échantillons ont été utilisés après plusieurs cycles de congélation-décongélation	Préparez plusieurs aliquotes
Des éléments interférents étaient présents dans l'essai	Veillez à utiliser un tampon de lavage contenant 0,01-0,05% de détergent et effectuez une seconde étape de lavage avec le tampon PBS sans détergent
Des échantillons anciens ou mal conservés ont été utilisés	Utilisez des échantillons frais et conservez-les correctement
L'étape de lavage était incomplète	Laisser une incubation de 5 à 10 minutes avec le tampon de lavage à chaque étape de lavage. Utiliser des agitateurs à faible vitesse pour faciliter un meilleur lavage
Les composants n'ont pas été correctement décongelés	Décongelez complètement tous les composants et mélangez-les soigneusement avant de les utiliser
Des réactifs périmés ou mal conservés ont été utilisés	Vérifiez la date d'expiration et stockez les composants de manière appropriée
	Si les tampons ont plus d'un mois, les filtrer avant de les utiliser
Les échantillons ont été conservés pendant une période prolongée	De préférence, préparer des réactifs frais avant chaque essai
Des temps ou des températures d'incubation incorrecte ont été choisis	Se référer aux directives du fabricant et vérifier les temps et températures d'incubation corrects

Des volumes incorrects ont été utilisés	Utilisez des pinettes calibrées et des embouts standards
Courbe d'étalonnage non linéaire	
Les composants partiellement décongelés ont été utilisés dans l'essai	Décongeler et remettre en suspension tous les composants avant de préparer le mélange réactionnel
Une contamination croisée s'est produite	Changez toujours les embouts d'un ensemble d'échantillons de concentrations à un autre
Des erreurs de pipetage se sont produites lors de la préparation des solutions standards	Évitez de pipeter de très petits volumes
Des erreurs de pipetage se sont produites lors de la préparation des mélanges réactionnels	Préparer un mélange réactionnel de base
Des bulles d'air se sont formées dans les puits	Pipeter doucement contre les parois des puits et/ou des tubes
	Effectuer un lavage et une incubation de blocage pendant la nuit
Les solutions mères standard avaient des concentrations incorrectes	Se référer aux instructions du fabricant pour la procédure de dilution standard
Les calculs ont été effectués par erreur	Revérifiez les calculs après avoir consulté les instructions du fabricant
Des réactifs de substitution provenant d'anciennes préparations ont été utilisés	Utiliser des composants frais
Résultats imprévus	
Les échantillons ont été mesurés à des longueurs d'onde incorrectes	Vérifiez l'équipement de lecture et les réglages du filtre
Les plaques vides produisent un signal de fond élevé	Effectuez un test de sensibilité (lire un puits vide) avant de réaliser les expériences. Si le signal est enregistré comme élevé, modifiez les paramètres du filtre
Les bandes ont été choisies dans différents lots	Utilisez toujours les bandes du même lot
L'utilisateur a oublié l'emplacement exact des échantillons dans la plaque à puits	Toujours étiqueter les plaques de puits soigneusement et clairement
Le temps d'incubation après l'ajout du TMB n'était pas constant.	Évitez les incohérences dans les temps d'incubation. L'utilisation d'une pipette multicanaux peut être d'une

	grande aide pour gagner du temps et charger les puits avec une plus grande précision
	Ajoutez le tampon d'arrêt (selon les directives du fabricant) une fois le temps d'incubation terminé
Les échantillons contenaient des substances interférentes	Répéter l'essai avec des concentrations d'analyte prédéterminées
Les lectures d'échantillons ont été enregistrées au-dessus ou au-dessous de la gamme linéaire	Concentrer ou diluer les échantillons pour amener la lecture dans la plage linéaire
	Calculer le nombre maximum de biomolécules qui devraient se lier aux puits et maintenir la concentration dans cette plage

ملخص

تظل الإصابة بفيروس نقص المناعة البشرية مشكلة صحية عامة . أجريت دراسة للتشخيصات المصلية لفيروس نقص المناعة البشرية باستخدام تقنيات اليزا في ولاية ورقلة خلال الفترة من 1 يونيو 2020 إلى 1 مايو 2021 وكان الهدف من دراستنا هو دراسة أداء ومراقبة تقنيات اليزا لتشخيص الأمصال فيروس نقص المناعة البشرية , ووصف الملامح الوبائية لعدوى فيروس نقص المناعة البشرية الايدز خلال فترة الدراسة على مستوى CDR (المركز المرجعي الادارة عدوى فيروس نقص المناعة البشرية) . تم تحديد 226 مريضا تستوفي معايير التضمين لدينا وتظهر هذه الدراسة غلبة الإناث والشباب على أنهم أكثر تضررا.

الكلمات المفتاحية : تشخيص , مصلي , فيروس نقص المناعة البشرية , اليزا.

Résumé

L'infection par le VIH demeure un problème de santé publique. Une étude de diagnostics sérologiques de VIH par la technique d'ELISA à été effectuée au niveau de wilaya d'Ouargla sur période allant du 1 juin 2020 au 1 mai 2021. Notre étude avait pour objectifs d'étude performance et surveillance de la techniques d'ELISA pour diagnostics sérologiques de VIH et décrire le profile épidémiologie d'infection durant la période d'étude au niveau CDR (centre de référence de prise en charge d'infection VIH) . 226 maladies répondant à nos critères d'inclusions ont été recensés . Cette étude à montre une prédominance de sexe féminin et les adultes jeunes étant les plus touchés

Mots clés : Diagnostiques, sérologiques, VIH, ELISA.

Abstract

HIV infection remains a public health problem. A study of serological diagnoses of HIV by ELISA techniques was carried out in the wilaya of Ouargla over the periode from June 1 ,2020 to may 1,2021 .Our study was intended to study the performance and monitoring of the ELISA techniques to diagnose of HIV serology and describe the epidemiology profile of HIV /AIDS infection over the periode of study at CDR reference centre for the management of HIV infection . 226 diseases meeting our inclusion criteria were identified. This study shows a predominance of females and young adults being the most affected.

Keywords: diagnostic, serological, HIV, ELISA.