

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLEB, BLIDA-1

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHEIOLOGIE CELLULAIRE



Présenté pour l'obtention du diplôme de Master en
Science de la nature et de la vie
Option: génétique-physiologie

Thème

Intérêt de la PCR dans le diagnostic de certitude de l'hépatite C

Réalisé par :

BEKKOUCHE KARIMA et HASSAINE ZAHIA

Soutenu publiquement le

,Devant le jury composé de:

Mme BENCHABANE S
Mme KEBBAS S
Dr BENSALÉM B-A
Melle ZEROUTI K

LCB USDB 1
LCB USDB
MAA Université d'Alger
MAA USDB

Présidente
Examinatrice
Promotrice
Co-promotrice

Année universitaire 2016- 2017

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

A mes parents , pour l'amour que vous m'avez prodigué , et pour les valeurs humaines que m'aviez transmis .

A mon fiancé **MUSTAPHA** qui n'a laissé aucun effort pour venir à mon aide .

A mes sœurs **SABRINA ET FAIZA** et mes frères **MOHAMED ET DJEMEL** , et à toute ma famille (**BEKKOUCHE**) , mes amis (**ZAHIA, KANZA...**)qui m'ont accompagnée tout au long de mes études . Je vous adresse tout mon amour et ma reconnaissance.

KARIMA

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

A mes parents, pour l'amour que vous m'avez prodigué , et pour les valeurs humaines que m'aviez transmis .

A mes sœurs **HANEN ,DJAMILA** et **SARAH** ET mon frère **BILEL** , et à toute ma famille (**HASSAINE**) , mes amis (**KARIMA , KENZA...**)qui m'ont accompagnée tout au long de mes études . Je vous adresse tout mon amour et ma reconnaissance.

ZAHIA

Remerciements

Dans le cadre de la réalisation de ce mémoire de fin d'étude nous remercions :

Tout d'abord Dieu, le tout puissant et Miséricordieux, pour nous avoir donné la force, le courage et surtout la patience pour bien accomplir ce travail .

Nous remercions infiniment mon encadreur **Dr BENSALÉM B-A**, Maitre assistance ,chef de service dans laboratoire des hépatites virales à l'IPA pour son accueil, sa disponibilité, son aide dans la réalisation de ce travail, pour tous le temps qui il a consacré pour nous orienter sur les grands titres de notre stage avec un suivi constant et un intérêt démontré tout au long de notre travail.

Nos profonds remerciements sont adressés à notre Co- promotrice Melle **ZEROUTI K** Maitre assistance à l'université de Saad dahlab Blida. Pour avoir été disponible toute au long de la réalisation de ce mémoire, pour la qualité de son encadrement, pour son aide, son soutien, son orientation et ses conseils.

Nous adressons nos sincères remerciements à Mme **BENCHABANE S** de nous avoir fait l'honneur de présider le jury et d'évaluer le travail.

Nous tenons à adresser nos vifs remerciements à **Mme KEBBAS** pour l'honneur d'examiner ce travail.

Nos remerciements s'adressent également à tous les enseignants et les professeurs du département de biologie de l'université de Blida 1. Pour leurs efforts fournis durant toute la période d'étude ainsi qu'à tous ceux qui ont collaboré d'une façon ou d'une autre à notre formation.

Nous remercions aussi tout ce qui ont contribué de près au de loin à l'élaboration de ce travail.

SOMMAIRE

Remerciement	ii
Table de matières	v
Résumé	vi
Liste des abréviations	viii
Liste des figures.....	x
Liste des tableaux.....	xii
Introduction.....	1
Chapitre I : Généralité	
I.1. Virus de l'hépatite C	3
I.1.1. Historique et taxonomie	3
I.1.2. Structure	3
I.1.2.1. Protéines structurales	5
I.1.2. 2.Protéines non structurales.....	5
I.1. 3. Cycle infectieux du VHC	8
I.2. Génome et variabilité génétique du VHC	9
I.2.1. Organisation du génome.....	9
I.2.2. Variabilité génétique	11
I.3.pathogénie de l'hépatite C	14
I.3.1. l'histoire naturelle d'hépatite C	14
I.4.Epidémiologie	16
I.5. Transmission du VHC	17
I.6.Le diagnostic	19
I.6.1 .Test sérologiques	19
I.6.2.Testes moléculaire	20

Chapitre II ; Matériel et méthodes

II.1. Matériel	21
II.1.1. Matériel biologique	21
II.2. Méthodes	21
II.2.1. Méthodes de détection des anticorps anti-VHC	21
II.2.1.1. Technique microparticulaire par chimiluminescence ...	21
II.2.1.2. Technique immuno-enzymatique ELISA Wantai	22
II.2.2. Méthodes de mise en évidence et de quantification du génome viral.	24
II.2.2.1. RT-PCR sur COBAS®	24
II.3 Etude statistique	29

Chapitre III : Résultats et discussion

3.1. Résultats des données épidémiologiques	30
3.1.1. Répartition des patients selon le sexe	30
3.1.2. Répartition des patients selon la tranche d'âge	30
3.1.3. Répartition des patients selon la région	31
3.2. Résultats des tests immunologiques et la PCR	32
3.3. Etude de la discordance entre les tests immunologiques et la PCR	34
3.4 .Discussion générale	35
Conclusion générale	37
Références bibliographiques	38

Annexes

Résumé

Avec cette étude on a essayé de mettre en évidence l'intérêt de la quantification virale par PCR en temps réel dans le diagnostic des patients atteints d'hépatite C.

Nous avons étudié, de façon rétrospective, durant la période du stage, 189 patients atteints d'hépatites C. les patients ont été adressés au laboratoire de virologie de l'Institut Pasteur d'Alger (IPA) pour une quantification de la charge virale dans le cadre d'un bilan pré-thérapeutique ou d'un suivi de traitements.

Deux catégories de tests virologiques (sérologique et moléculaire) ont été utilisées pour le diagnostic de l'infection virale C, les tests sérologiques permettent la détection des anticorps spécifiques anti-HCV, marqueurs indirects de l'infection (CMIA, ELISA). Le test moléculaire permet la quantification de génome viral qui est l'ARN de VHC, un marqueur direct de l'infection par PCR en temps réel.

La quantification de la charge virale par PCR en temps réel joue aujourd'hui un rôle de premier plan dans le diagnostic de l'infection viral C, la technique PCR en temps réel est l'outil de choix du fait de sa rapidité, sa sensibilité et sa spécificité.

Mots clés Hépatite C, diagnostic sérologique, charge virale, PCR en temps réel.

Summary

Hepatitis C is an infectious disease transmitted by blood, caused by hepatitis C virus (HCV), which attacks the liver. The infection is characterized by liver inflammation (hepatitis) that is often asymptomatic but can progress to chronic hepatitis and later cirrhosis and hepatocellular carcinoma.

Our problem aims to evaluate the utility of viral quantification by real-time PCR in the diagnosis.

We studied, retrospectively, during the training period, 189 patients with hepatitis C and recruited at the level of different hospitals in Algiers. The patients were sent to the laboratory of virology of the Pasteur Institute of Algiers (IPA) for quantification of viral load in the context of a pre-therapeutic assessment or in a follow-up of treatments.

Two categories of virological tests (serological and molecular) were used in the diagnosis of viral infection C. Serological tests allow the detection of antibodies specific anti-HCV, indirect markers of infection (CMIA, ELISA). The molecular test allows the quantification of viral genome which is HCV RNA, direct markers of infection (real-time PCR).

Quantification of viral load by real-time PCR now plays a leading role in the diagnosis of hepatitis C, the real-time PCR is the tool of choice because of its speed, sensitivity and specificity.

Key words

Hepatitis C disease, serological diagnostic, viral load, real-time PCR.

إلتهاب الكبد الوبائي هو مرض معد ي ينتقل عن طريق الدم يسببه فيروس التهاب الكبد الوبائي سي ، الذي يهاجم الكبد. ويتميز هذا المرض بالتهاب الكبد ، و الذي غالبا ما يكون بدون أعراض ولكن يمكن أن يتطور إلى التهاب الكبد المزمن وتليف الكبد وسرطان الكبد في وقت لاحق.

هدف هذا البحث هو تقييم مدى فائدة تحديد الكمي الفيروسي من خلال رصد PCR في الوقت الحقيقي لتشخيص المرضى الذين يعانون من إلتهاب الكبد C.

درسنا بأثر رجعي على مدى عام 2016 . 189 مريضا مصابين بالتهاب الكبد الوبائي سي قدمو من مستشفيات مختلفة في الجزائر. و تم إحالة المرضى إلى مختبر الفيروسات في معهد باستور في الجزائر العاصمة لتحديد حجم الحمل الفيروسي في سياق تقييم ما قبل العلاج أو متابعة العلاجات.

فنتين من الاختبارات الفيروسية (المصلية والجزئية) تم إستخدامها في تشخيص العدوى الفيروسية C . الإختبارات المصلية. تسمح للكشف عن الأجسام المضادة المحددة. علامة غير مباشرة للعدوى (المصل) ، الإختبار الجزيئي يسمح بتقدير حجم الجينوم الفيروسي(الحمض النووي الريبي ARN) ، علامة مباشرة من العدوى (PCR في الوقت الحقيقي)

التحديد الكمي من الحمل الفيروسي من قبل PCR الوقت الحقيقي تلعب الآن دورا رائدا في تشخيص العدوى ,وتوجيه الخيارات العلاجية و تقييم الإستجابة للعلاج. PCR الوقت الحقيقي الآن هو الأداة المفضلة بسبب حساسيتها ، سرعتها و دقتها.

الكلمات المفتاحية

مرض التهاب الكبد C، التشخيص المصلي، التحديد الكمي، PCR الوقت الحقيقي .

Liste des abréviations

- CO** : valeur seuil.
- CR** : Cartouche de réaction.
- Ct** : Threshold cycle/ cycle seuil
- ELISA** : Enzyme –linked –immuno-sorbent-assay.
- VHA** : Virus de l'hépatite A.
- VHB** : Virus de l'hépatite B.
- VHC** : Virus de l'hépatite C.
- IgG** : Immunoglobuline de type G.
- IgM** : Immunoglobuline de type M.
- IgA** : Immunoglobuline de type A.
- IPA** : Institut Pasteur d'Alger.
- IRES** : Internal ribosomal entry site.
- KDa** : Kilo-daltonien.
- CMIA** : Micoparticulaire enzymatique immuno assay.
- NC** : Non codant.
- Ns** : Non structural.
- NTR/UTR** : NO translate region /Un-translated region /region non traduite.
- ORF** : Open reading frame /cadre ouvert de lecture.
- P7** : protéine 7.
- PCR** : Polymerase chaine reaction .
- QS** : contrôle interne
- RT-PCR** : Reverse transcriptase PCR.
- S** : échantillon.

UI/ml : Unité internationale /millilitre.

ULQ : Upper limit of quantitation / limite supérieure de quantification.

URL : Unité relative de lumière

VIH : Virus immuno –dificience humaine.

Listes des figures

- Figure 1 :** Structure du VHC. (a). Représentation schématique d'une particule virale ; (b). Micrographies issues d'une observation au microscope électronique du VHC **Page 4.**
- Figure 2 :** Schématisation de l'ensemble des protéines codées par le génome du VHC. (a), la répartition des protéines sur le génome viral ; (b), la structure et la fonction de chaque protéine virale..... **Page 7.**
- Figure 3 :** Cycle viral du VHC..... **Page 9.**
- Figure 4 :** Organisation du génome du VHC. (a), schématisation des trois régions du génome, (b). Schéma détaillé la région 5' non codante du VHC..... **Page 11.**
- Figure 5 :** phylogénique du HCV..... **Page 13.**
- Figure 6 :** Hépatite aigue C évoluent vers la guérison..... **Page 15.**
- Figure 7 :** Hépatite aigue C évoluent vers la chronicité **Page 15.**
- Figure 8 :** évolution naturelle de l'hépatite **Page 16.**
- Figure 9 :** Distribution de la séroprévalence anti-VHC selon les pays..... **Page 17.**
- Figure 10 :** Représentation schématique générale du principe d'ELISA..... **Page 23.**
- Figure 11 :** Principe de détection des produits d'amplification par PCR utilisant la méthode TaqMan®..... **Page 26.**
- Figure 12 :** Principe de la PCR quantitative en temps réel avec sonde TaqMan **Page 26.**
- Figure 13 :** Suivi de la cinétique d'une réaction de PCR en temps réel..... **Page 29 .**
- Figure 14 :** Répartition des patients selon le sexe..... **Page 30.**
- Figure 15 :** Répartition des patients en fonction des tranches d'âge..... **Page 31.**
- Figure 16 :** Répartition des patients en fonction de la région..... **Page 32.**

Liste des tableaux

Tableau I : Estimation de la prévalence de l'infection par le VHC dans le monde par région.
.....**Page 16.**

Tableau II : Interprétation des valeurs S/CO pour la méthode CMIA**Page 22.**

Tableau III : Interprétation des résultats pour la méthode ELISA 2**Page 24.**

Tableau IV : Effectif et pourcentage relatif des résultats sérologiques et de la PCR...

..... **Page 33 .**

Tableau V : Discordance entre les résultats immunologiques et la PCR**Page 34.**

INTRODUCTION

Grâce aux techniques de biologie moléculaire (**Halfon et Cacoub ,2000**), Le virus de l'hépatite C (VHC) a été identifié en 1989 comme étant l'agent responsable de la majorité des hépatite non A non B (**Choo, 1989**), par l'équipe de Michael. (**Pawlotsky ,2002**)

L'infection par le virus de l'hépatite C (VHC) est considérée comme un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale. (**Bahadi,2013**), peut demeurer asymptomatique pendant des décennies, (**Ha et al ., 2016**), pouvant aboutir en l'absence de traitement, à des complications hépatiques sévères, telles que la cirrhose ou le carcinome hépatocellulaire. (**Gozlan , 2016**)

Le dépistage de l'hépatite C est indispensable pour la détection précoce et pour améliorer la santé de la population . (**Ha et al ., 2016**)

Le diagnostic de l'hépatite C commence par des tests sérologiques, qui permettent de détecter les anticorps anti HCV(ELISA) et les tests moléculaires qui permettent d'évaluer le degré de réplication du virus de l'hépatite C.

L'introduction de la nouvelle technique de la PCR en temps réel permet une quantification plus sensible et plus précise du génome viral. Elle permet un diagnostic plus rapide et plus sensible.

Notre étude réalisée au sein du laboratoire des hépatites virales (IPA), qui porte sur les patients adressées pour la charge virale.

La première partie s'avère une étude bibliographique qui commence par des informations générales sur le virus de l'hépatite C, pathogénie de l'hépatite C, et à la fin le diagnostic des infections virales C.

L'objectif de ce travail est :

De mettre en évidence l'intérêt de la quantification virale C par PCR en temps réel dans le diagnostic des patients atteint d'hépatite C.

Chapitre I
Etude
bibliographique

I.1. Virus de l'hépatite C

I.1.1. Historique et taxonomie

Au milieu des années 70, les tests sérologiques réalisés sur du sang provenant de patients transfusés atteints d'hépatite montrèrent que seulement 25 % des cas ont étaient infectés par l'hépatite B (VHB) et qu'aucun ne l'était par l'hépatite A (VHA). Cependant le 75 % restant des hépatites post transfusionnelles n'étaient dues ni au VHA ni au VHB, mais à un virus différent fut qualifiée de "non-A non-B" (**Einstein et al., 1935; Fabiani et al., 2003; Hajarizadeh et al., 2013**).

Ce n'est qu'en 1989 que ce virus a été identifié pour la première fois et nommé virus de l'hépatite C (VHC). L'utilisation de la biologie moléculaire et de la technologie de l'ADN recombinant ont permis à l'équipe de Michael Houghton et celle de Daniel Bradley cette découverte de VHC sans isolement préalable de la particule virale (**Einstein et al., 1935; Fabiani et al., 2003; Hajarizadeh et al., 2013**).

Comme les virus VHA et VHB, le VHC a été classé au sein de la famille des *Flaviviridae* mais dans un nouveau genre dont le nom d'*Hepacivirus* a été proposé (**Fabiani et al., 2003; Mauss et al., 2014**).

I.1.2. Structure

Le VHC est un petit virus enveloppé d'environ 55 à 65 nm de diamètre. Ce virus à ARN de polarité positive est constitué d'une nucléocapside icosaédrique entourée d'une enveloppe lipidique dans laquelle sont ancrées deux types de glycoprotéines d'enveloppe, l'E1 et l'E2 formant des hétérodimères non covalents (**Figure 1**) (**Chisari and Francis, 2005; Stambouli and Oumaima, 2014**).

L'ARN virale code pour plusieurs protéines structurales et non structurales indispensables au cycle viral (**Figure 2**) :

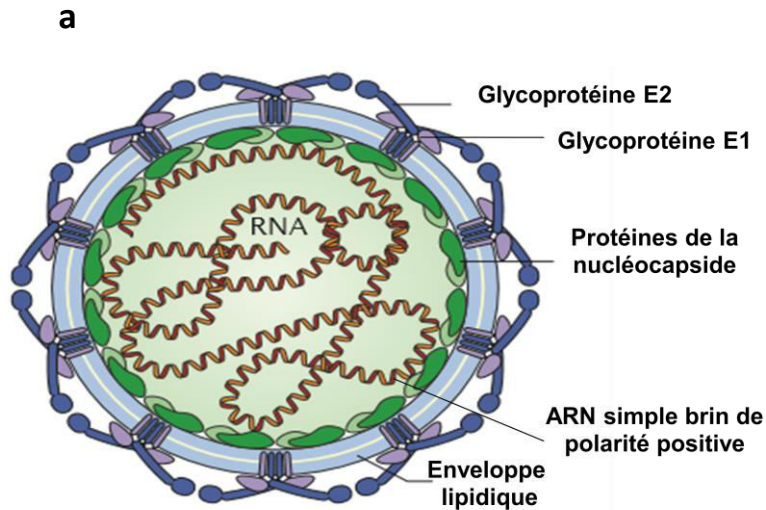
I.1.2.1. Protéines structurales

a. Protéine de capsid C

Elle présente des sites de liaison potentiels à l'acide désoxyribonucléique (ADN) et à l'ARN ainsi que des domaines de dimérisation . La séquence de cette protéine est bien conservée entre les différents isolats. Sa localisation est cytoplasmique et semble associée à des gouttelettes lipidiques.

Elle présente un grand nombre d'activités fonctionnelles en plus de sa fonction d'encapsidation de l'ARN du VHC. Il a en effet été montré que l'expression de la capsid du VHC modulait la régulation de différents promoteurs cellulaires ou voies de signalisations (c myc, IL2, p53, p21, NFkB, etc.).

Elle interagit avec différentes protéines cellulaires et module la croissance et la viabilité cellulaire (apoptose/prolifération) dans certaines conditions (niveau d'expression et type cellulaire), et dans certains modèles in vitro et in vivo (souris transgéniques). Elle induit aussi la transformation cellulaire (Soussan et al.,2010).



b

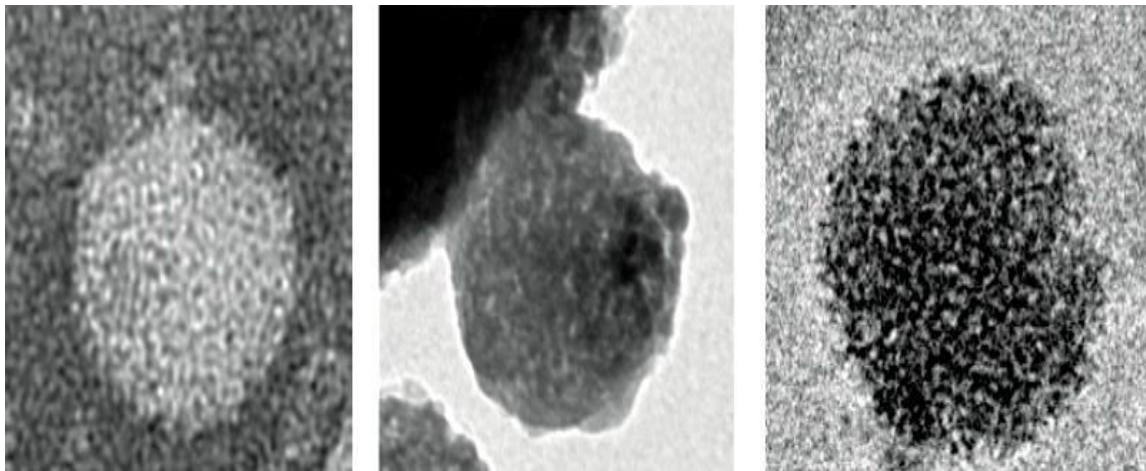


Figure 1. Structure du VHC. (a). Représentation schématique d'une particule virale ; (b).Micrographies issues d'une observation au microscope électronique du VHC (Lindenbach et al., 2013)

b. Glycoprotéines de l'enveloppe E1 et E2

Les glycoprotéines E1 et E2 font partie de l'enveloppe virale et sont impliquées dans la neutralisation du virus (**Voisset and Dubuisson 2004**). Elles ont des masses moléculaires de 33-35 et 70-72 kDa, respectivement, ce qui correspond à 192 acides aminés pour E1 et 363 acides aminés pour E2. Ils s'assemblent dans le RE sous forme d'hétérodimères non covalents (**Deleersnyder, Pillez et al. 1997, Op De Beeck, Voisset et al. 2004**). Ces glycoprotéines sont des protéines transmembranaires de type I et sont composées d'un ectodomaine N-terminal et d'une région hydrophobe C-terminal d'ancrage dans les membranes. Les 27 acides aminés N-terminaux d'E2 constituent la région hypervariable 1 (HVR1) avec un rôle probable dans l'entrée du virus permettant à celui-ci d'échapper au système immunitaire (**von Hahn, Yoon et al. 2007**). Ainsi, E2 joue un rôle crucial dans les premières étapes de l'infection. La protéine E1 semble être impliquée dans le processus de fusion membranaire nécessaire à l'internalisation du virus dans la cellule cible (**Lavillette, Pecheur et al. 2007**) (**Figure 2**).

I.1.2.2. Protéines non structurales

a. la protéine p7

La p7 est une petite protéine hydrophobe dispensable à la réplication de l'ARN viral, mais essentielle pour la production de virus infectieux *in vivo* et *in vitro*, suggérant un rôle potentiel de cette protéine dans l'assemblage et la libération du virus (**Steinmann and Pietschmann 2010, Madan and Bartenschlager 2015**). P7 a deux fonctions, notamment 1) participer à l'élaboration de particules virales par la médiation de l'interaction entre les glycoprotéines de l'enveloppe et NS2, et 2) former un canal afin de réguler l'étape de maturation intracellulaire des particules VHC afin de les rendre pH résistantes et infectieuses (**Madan and Bartenschlager 2015**).

b. Protéines NS2-NS5

Le VHC possède un ensemble de protéines enzymatiques indispensables à son cycle infectieux (**Figure 2**) :

- **NS2 (p23)** : est une protéine transmembranaire avec une activité cystéine protéase, elle assure un rôle crucial durant la phase d'assemblage virale (**Pawlotsky and Jean, 2002**).

- **NS3 (p70)** : est une protéine hydrophile de 67 kDa qui possède un domaine sérine protéase dans son tiers N-terminal et un domaine NTPase/hélicase dans ses deux tiers C-terminaux. L'activité protéasique de la NS3 assure le clivage des autres régions non structurales (NS4 et NS5), tandis que son activité hélicase aurait probablement une action dans le déroulement de l'ARN génomique au cours de la réplication **(Pawlotsky and Jean, 2002). (Figure 2)**

- **NS4** : est formée par deux protéines distinctes, la NS4A (p8) et la NS4B (p26).
La NS4A est une petite protéine transmembranaire de 54 acides aminés zinc dépendante, elle forme un hétérodimère protéasique avec la NS3 où elle assure la fonction d'un cofacteur pour cette dernière.
- La NS4B est une petite protéine hydrophobe transmembranaire de 27 kDa, impliquée dans la réplication et l'organisation membranaire au cours du cycle viral **(Pawlotsky and Jean, 2002). (Figure 2)**.

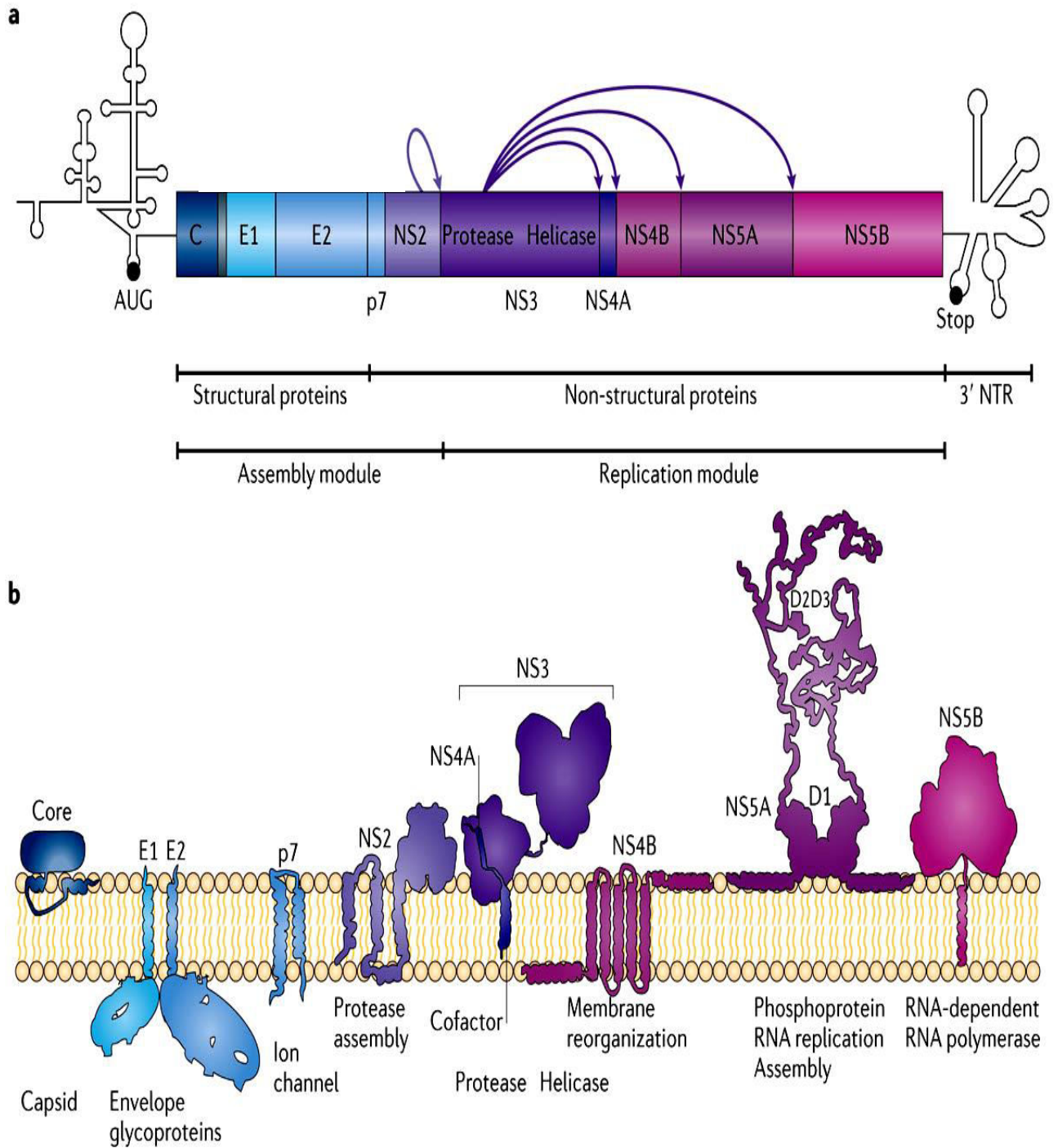


Figure 2. Schématisation de l'ensemble des protéines codées par le génome du VHC. (a), la répartition des protéines sur le génome viral ; (b), la structure et la fonction de chaque protéine virale (**Bartenschlager et al., 2013**)

-**NS5** : formée par deux complexes protéiques, la NS5A (p56/58) et NS5B (p68).

La NS5A est une protéine modérément hydrophile qui existe sous deux formes distinctes, de poids moléculaires respectifs 56 et 58 kDa. Elle participe probablement à la régulation de l'activité de l'ARN polymérase virale (**Helle and Cocquerel, 2008**) .

La NS5B est une protéine phosphorylée de 68 kDa localisée, il a été démontré *in vitro* que cette protéine contient des motifs conservés caractéristiques des ARN polymérases dépendantes de l'ARN qui lui confèrent une activité ARN polymérase indispensable à la réplication du VHC (**Helle and Cocquerel, 2008**) (**Figure 2**).

I.1.3. Cycle infectieux du VHC

Le cycle viral du VHC est basé sur le modèle général des *Flavivirus* (**Figure 3**) qui passe par les étapes suivantes :

- La première étape (a) correspond à la liaison des virus avec les récepteurs spécifiques présents à la surface des cellules cibles, les hépatocytes. Le mécanisme moléculaire exact de cette liaison reste à élucider. Néanmoins, les études ont confirmé l'implication de certaines molécules comme les glycosaminoglycanes, la protéine CD81 sur les hépatocytes et le récepteur des LDL sur les lipoprotéines (**Moradpour et al., 2007 ; Helle and Cocquerel, 2008**) .
- Le virus une fois endocyté, libère son ARN viral dans le cytoplasme et les protéines virales sont traduites puis synthétisées sous forme d'une polyprotéine adressée dans le réticulum endoplasmique (b et c) (**Helle and Cocquerel, 2008**).
- L'ARN positif du génome est converti en ARN négatif, ce dernier sert comme matrice pour la synthèse de nouvelles molécules d'ARN virales, en parallèle, les protéines structurales s'assemblent pour former les nouvelles particules du VHC (**Helle and Cocquerel, 2008**) .

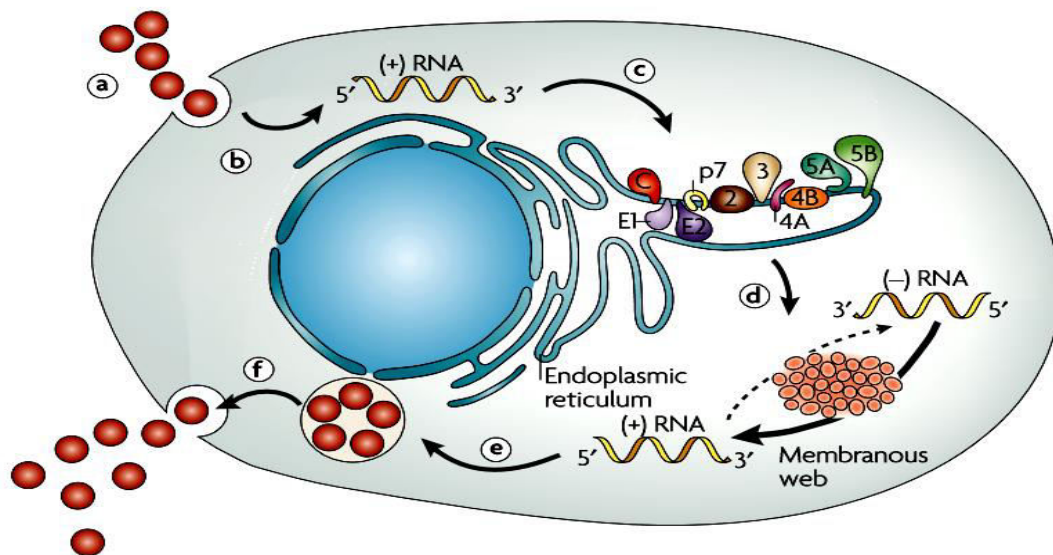


Figure 3. Cycle viral du VHC.(Moradpour et al., 2007).

I.2. Génome et variabilité génétique du VHC

I.2.1. Organisation du génome

Le génome du VHC est un ARN linéaire monocaténaire de polarité positive d'environ 9,6 kb. C'est un génome riche en nucléotides G-C et très structuré dans les cellules infectées par le virus ou dans les particules virales (Pawlotsky and Jean, 2002) .

Il comprend trois régions distinctes dans le sens 5'3' ; une région non codante 5', un cadre de lecture ouvert et une région non codante 3' (Pawlotsky and Jean, 2002) (Figure 4a).

La région 5'non codante est constituée des 341 premiers nucléotides du génome, elle est formée de 3 à 5 codons AUG non initiateurs de la traduction et 4 domaines riches en structures tiges-boucles nommés de I à IV. C'est une région très conservée chez les différents variants du HCV vu son rôle majeur et vital pour le virus dans la réplication et la synthèse des protéines virales (Pawlotsky and Jean, 2002) (Figure 4b).

Cette partie du génome ne comporte pas de coiffe méthylée mais elle contient un site interne d'entrée du ribosome (IRES) formé par les domaines tiges-boucles II, III et IV. L'IRES est la structure qui fixe la sous unité 40S du ribosome, elle est responsable à l'initiation de la traduction du cadre de lecture ouvert codant la poly-protéine précurseur des protéines structurales et non structurales (Figure 4b) (Pawlotsky and Jean, 2002) .

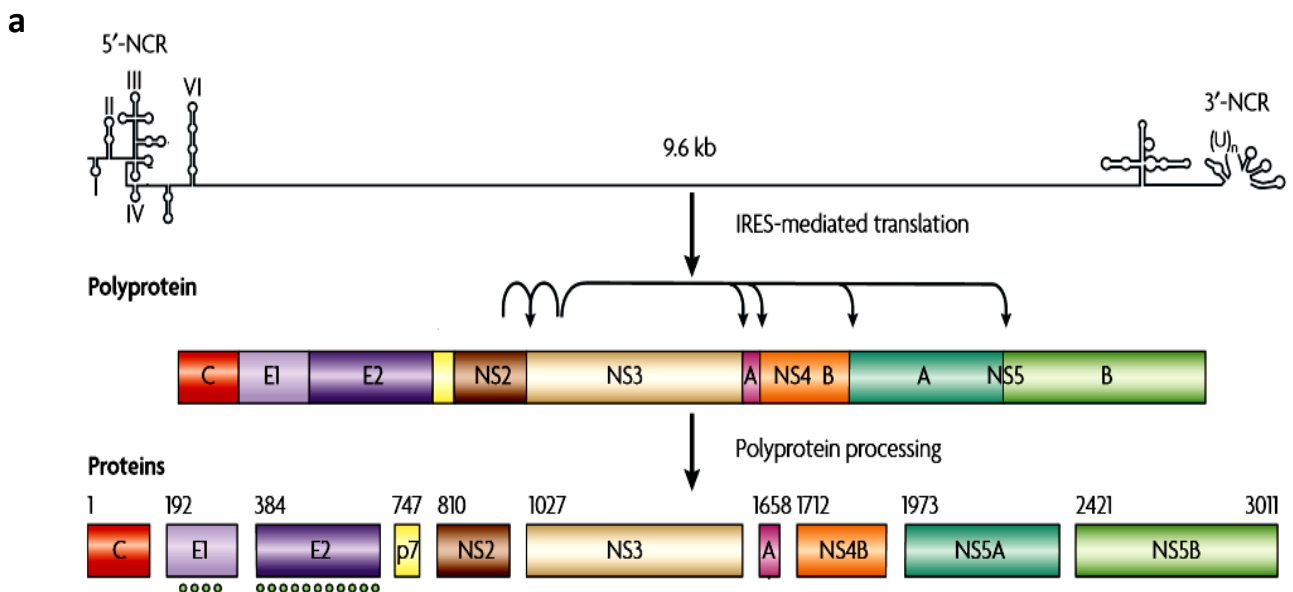
En aval de la région 5' non codante est situé le grand cadre de lecture ouvert (open reading frame ou l'ORF). Il comporte environ 9024 à 9111 nucléotides et débute par un codon AUG initiateur de la traduction. L'ORF code pour une polyprotéine précurseur qui après traduction dans les cellules infectées et clivage par les protéines virales (NS2 et NS3) et cellulaires donne naissance aux protéines virales structurales et non structurales (**Figure 4a**) (**Pawlotsky and Jean, 2002; Lunel et al., 2003**).

Enfin, la région 3' non codante comportant trois parties successives (**Figure 4a**):

- une partie non traduite d'environ 30 nucléotides, variable d'une souche virale à une autre ;
- Une partie poly-U de longueur variable d'une souche virale à une autre ;

Une partie 3' terminale de 98 nucléotides, très conservée, connue sous le nom de la région X, structurellement repliée en trois tiges-boucles successives (**Pawlotsky and Jean, 2002**).

La région 3' non codante semble jouer un rôle important dans l'initiation de la synthèse du brin d'ARN négatif lors de la réplication. En plus cette région est indispensable à la fixation de la PTB (polypyrimidine tract-binding protein), une protéine régulatrice impliquée dans l'initiation de la traduction (**Pawlotsky and Jean, 2002**).



b

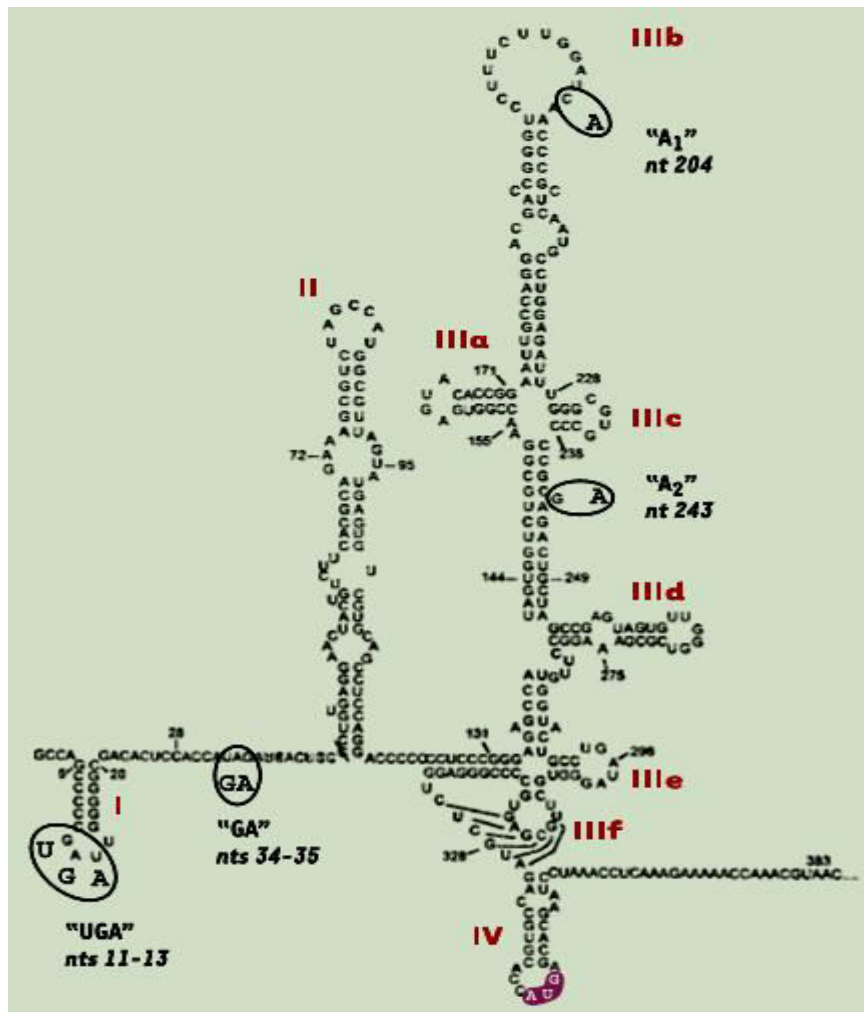


Figure 4. Organisation du génome du VHC. (a), schématisation des trois régions du génome, (b). Schéma détaillé la région 5' non codante du VHC (Pawlotsky and Jean, 2002 ; Moradpour et al., 2007).

I.2.2. Variabilité génétique

La découverte du VHC par la biologie moléculaire a été rapidement suivie de la découverte d'une importante variabilité génétique de ce virus lorsqu'ont été analysés les isolats provenant de différentes régions du monde (Nousbaum et al., 1998).

Cette variabilité génétique du VHC est importante résultant d'un le taux de mutation élevé de l'ordre de 10^{-3} substitutions par site et par an. Cette variabilité affecte la totalité du génome, mais prédomine au niveau de la protéine d'enveloppe E1 et E2, en particulier au niveau de région N-terminale appelées les domaines hypervariables. En revanche, la région 5' non codante est hautement conservée parmi les différentes souches virales. En effet, la

variabilité génétique s'exprime à deux niveaux ; le génotype et la quasi-espèce (**Figure 5**) (**Nousbaum et al., 1998**).

a. Génotype

Basé sur le séquençage et la construction d'arbre phylogénique, les différents variants du VHC ont été classés en six principaux groupes de génotypes, correspondant aux six branches majoritaires de cet arbre et portant la numérotation de 1 à 6 et dont l'homologie de séquence entre les différents génotypes est de l'ordre de 70 % (**Asselah et al., 2000**) (**Figure 5**).

En plus des génotypes, de nombreux sous-types ont été établis (sous embranchements de l'arbre phylogénique) et désignés dans l'ordre chronologique de leur description par les lettres alphabétiques minuscules (a, b, c.....etc.). L'homologie de séquence entre les différents sous-types est d'environ 80 % à 90 % (**Asselah et al., 2000**) (**Figure 5**).

La répartition géographique des différents génotypes est à présent bien établie et reflète l'histoire épidémiologique du virus. Certains types sont présents dans l'ensemble des régions du monde : les types 1, 2 et 3 rendent compte de la majorité des infections par le virus C en Europe de l'Ouest et en Amérique du Nord. D'autres types, plus rares, sont plus localisés dans une région géographique précise : le type 4 a été identifié avec une forte prévalence en Afrique Centrale, en Afrique du Nord et dans le Moyen Orient, le type 5 est essentiellement limité aux populations d'Afrique du Sud, le type 6 au Sud-est asiatique (**Nousbaum et al., 1998**). (**Figure 5**).

b. Quasi-espèce

Durant la réplication des virus à ARN, des erreurs sont introduites de manière aléatoire dans leur génome par les ARN polymérases ARN dépendantes, en absence de système performant de vérification de lecture. Ces erreurs apparaissent sous forme de mutations ponctuelles, des délétions ou, à l'inverse, des insertions (**Asselah et al., 2000**).

Dans le cas du VHC, l'émergence des variants génomiques conduit à la coexistence de plusieurs molécules d'ARN distinctes mais très proches chez un même hôte d'où vient

la notion de la quasi-espèce. Cette dernière correspond à la population formée de l'ensemble des variants viraux présents chez un même malade à un instant donné.

La quasi-espèce est, d'une part, engendrée par la non-fidélité de l'ARN polymérase ARN dépendante et, d'autre part, sélectionnée par le système immunitaire de l'hôte. Certains variants peuvent être plus adaptés à un environnement cellulaire que d'autres (Asselah et al, 2000).

Pour le VHC, ces quasi-espèces diffèrent le plus souvent par quelques mutations (plus de 90 % d'homologie de séquence) essentiellement dans leur région hypervariable (Asselah et al., 2000).

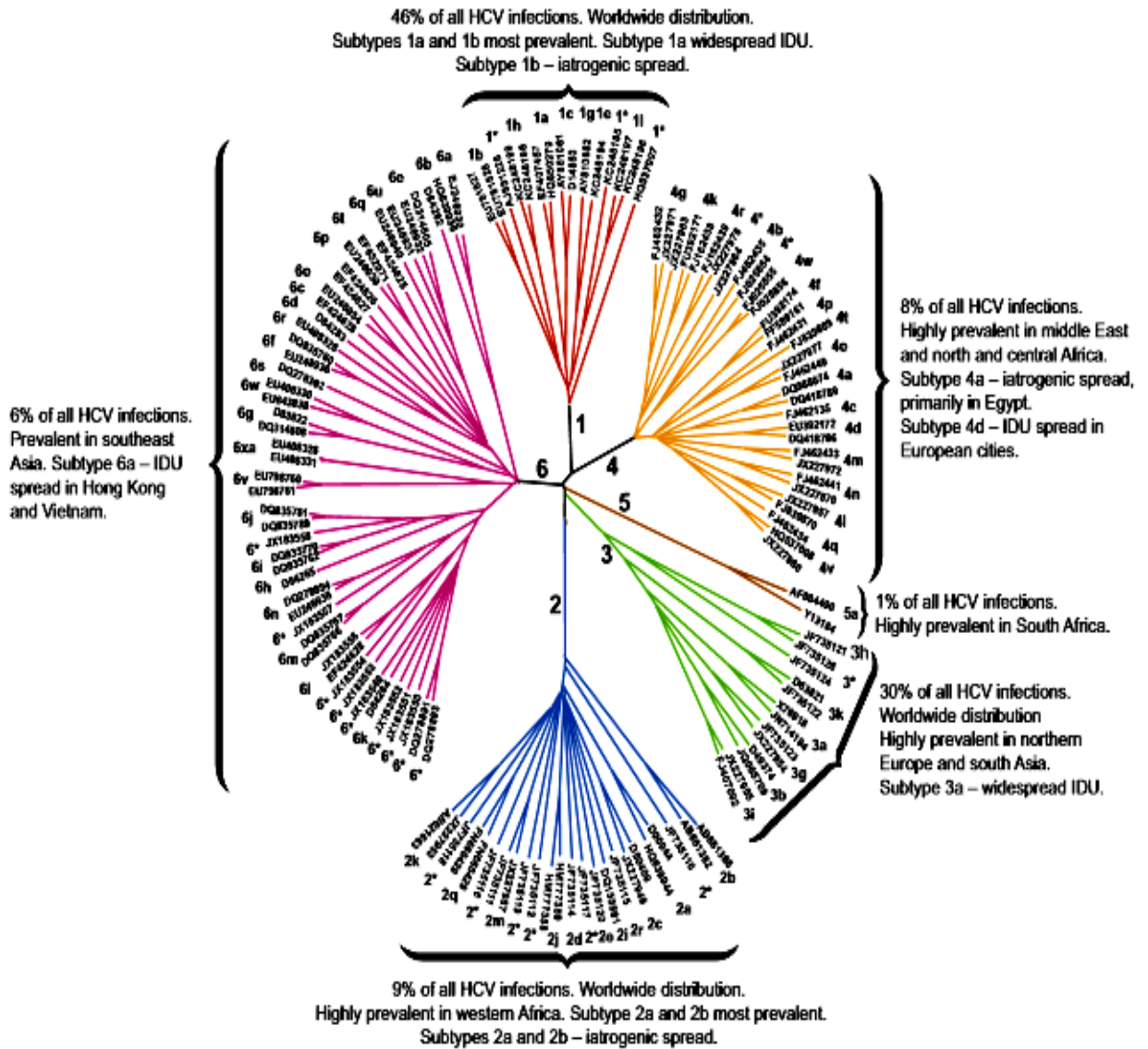


Figure 5. Arbre phylogénique du HCV (Bukh and Jens,2016) .

I.3.pathogénie de l'hépatite C

I.3.1. l'histoire naturelle d'hépatite C

L'hépatite C, une inflammation du foie causée par le virus de l'hépatite C (VHC), est d'origine infectieuse et peut provoquer une maladie chronique à laquelle s'ajoute la dimension de transmission.(**Ha et al.,2016**) .

L'infection primaire à VHC correspond habituellement à une hépatite aiguë, Les éventuels symptômes sont non spécifiques : fatigue, nausées et douleur de l'hypochondre droit. Uniquement ictérique dans 20% des cas et rarement fulminante, L'état signant une hépatite aiguë apparaît dans un délai d'un à six mois. Le virus se développe rapidement. Son ARN peut être mis en évidence dans le sérum par PCR dès la première semaine suivant la contamination. En réponse à l'infection, le système immunitaire produit des anticorps anti-VHC détectables par un test Elisa à partir de la sixième semaine suivant la contamination et une élévation des transaminases débute dès la quatrième semaine pour atteindre progressivement un pic supérieur à dix fois la normale. (**Moradpour et al., 2007**)

La guérison est biologiquement constatée par une normalisation des transaminases à la dixième semaine et une baisse significative des anticorps anti-VHC Dans seulement 10 à 40 % des cas, l'organisme parvient à détruire spontanément le virus. (**Moradpour et al., 2007**) Chez la majorité des patients (80%), l'infection primaire évolue vers une hépatite chronique. par incapacité de l'organisme à éliminer totalement le virus.(**Miallhes and Trepo, 2000**).Qui désigne une inflammation évolutive du foie qui dure depuis plus de six mois.

L'évolution vers la cirrhose se fait chez 10 à 20 % des patients atteints d'hépatite C chronique et l'incidence annuelle de survenue d'un carcinome hépatocellulaire chez les patients cirrhotiques est d'environ 1 à 5 % (**Lacroix et al., 2016**)

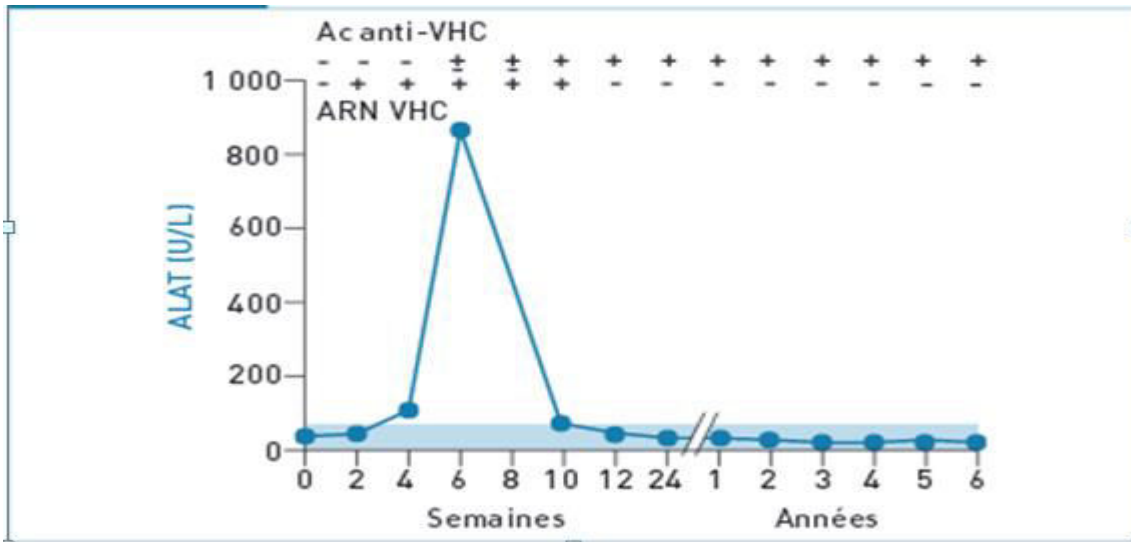


Figure 6 : Hépatite aigue C évoluent vers la guérison.(Marcellin et al.,2007)

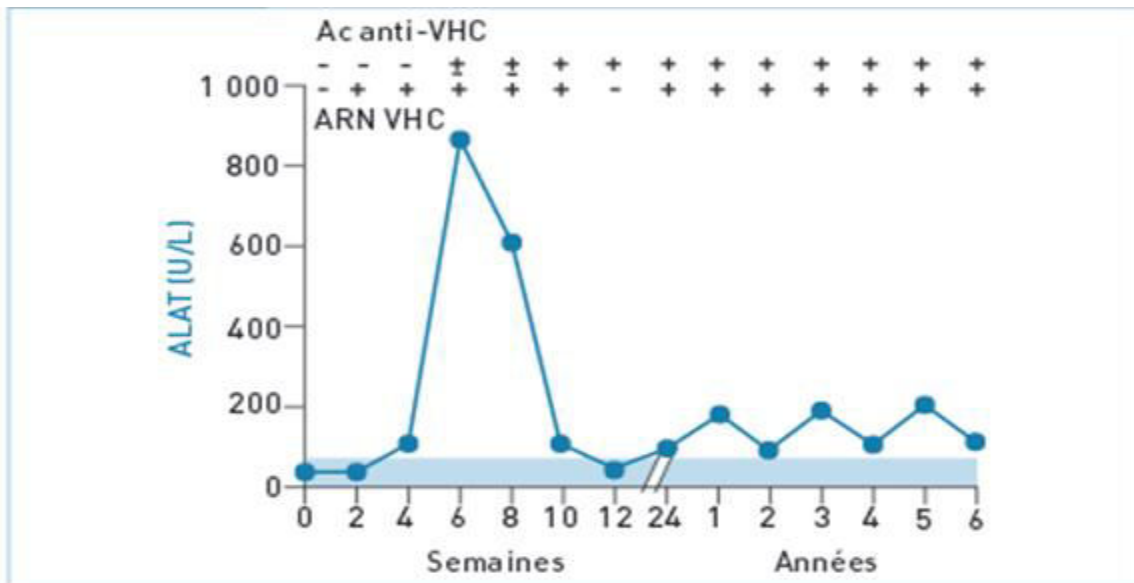


Figure 7 : Hépatite aigue C évoluent vers la chronicité.(Marcellin et al.,2007)

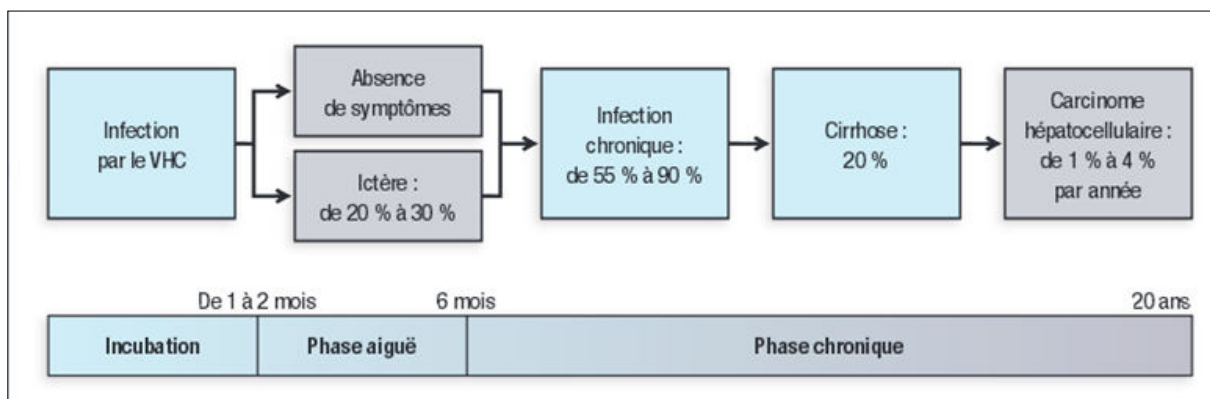


Figure 8 : évaluation naturel de l'hépatite (Fournier et al, 2012)

I.4.Epidémiologie

Depuis l'introduction des tests de dépistage du virus de l'hépatite C (VHC), un grand nombre de données sur l'épidémiologie des infections liées à ce virus ont été acquises, à partir des données disponibles, l'OMS a estimé qu'en 1999, 170 millions de personnes (2,9 %) vivaient avec une infection à VHC, la prévalence variant de 0,4 % en Océanie à 5,3 % en Afrique (**Tableau I**). L'Europe et l'Amérique du Nord compteraient environ 22 millions de sujets séropositifs pour le VHC contre 147 millions pour le reste du monde, dont 31,9 millions en Afrique. (**Desenclos , 2003 ; Broutinet al., 2006**)

TableauI: Estimation de la prévalence de l'infection par le VHC dans le monde par région. (**Desenclos , 2003**)

Région OMS	Population (millions)	Prévalence (%)	Nombre d'infectés (millions)
Afrique	602	5,3	31,9
Amérique	785	1,7	13,1
Méditerranée orientale	466	4,6	21,3
Europe	858	1,0	8,9
Asie du Sud-Est	1500	2,2	32,3
Pacifique occidentale	1600	3,9	62,2
Total	5811	2,9	169,7

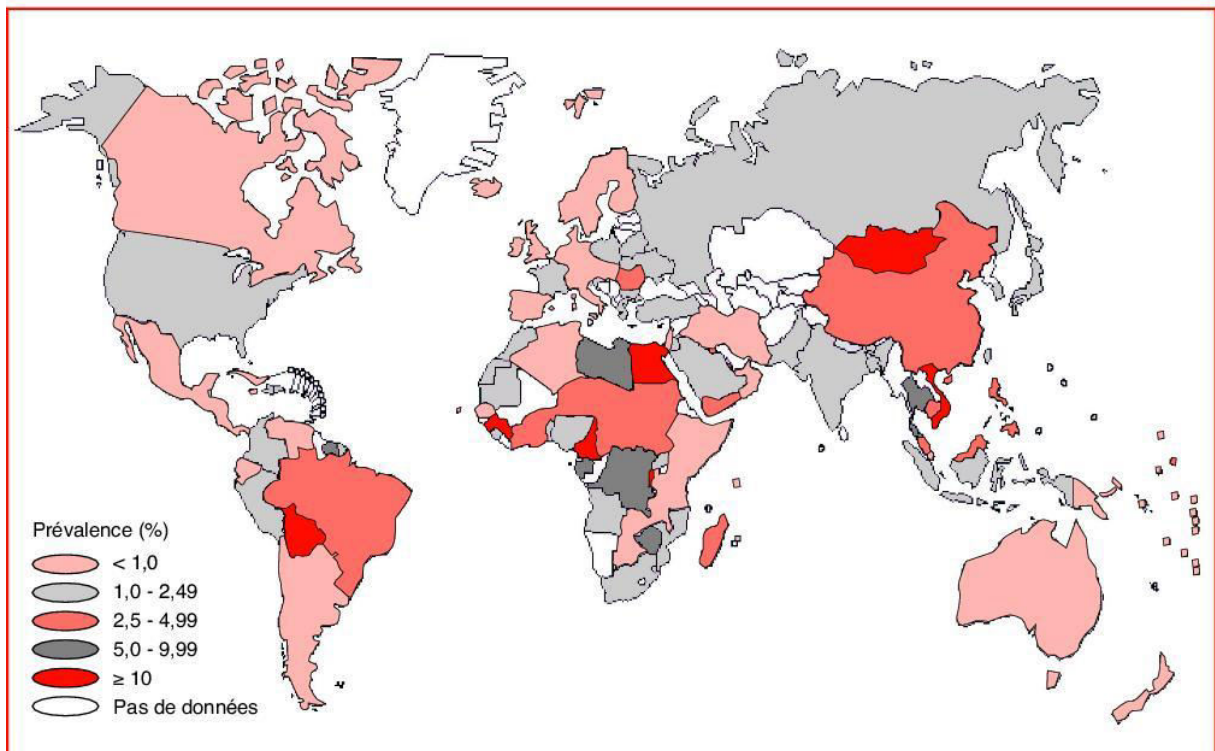


Figure 9 : Distribution de la séroprévalence anti-VHC selon les pays. (OMS, 1999)

I.5. Transmission du VHC

Le VHC est transmis par voie parentérale. La contamination résulte de la mise en contact du sang d'une personne infectée par le virus avec celui d'une personne indemne (susceptible) de manière directe (transfusion) ou indirecte. (**Desenclos, 2003**)

***Transfusion de sang et/ou de produits sanguins**

La transfusion de produits sanguins a été la première cause reconnue et a joué un rôle majeur dans la diffusion de l'infection jusqu'en 1990. La sécurisation du sang et des produits sanguins a permis de tarir cette source d'infection. Le risque de contamination transfusionnelle a été lié à plusieurs facteurs : la prévalence de l'infection virale C chez les donateurs de sang, la date de transfusion, le nombre et le type de produits transfusés. (**Broutin et al., 2006**)

*** contamination nosocomiale**

Le rôle joué par la contamination nosocomiale est difficile à évaluer. En dehors des transfusions, la contamination nosocomiale relève essentiellement de l'utilisation de matériel mal désinfecté. Le risque de transmission de malade à malade, par l'intermédiaire d'objets souillés, a été bien démontré dans les centres d'hémodialyse chez des malades non transfusés, en endoscopies digestives avec biopsie et à l'occasion de l'utilisation inadéquate d'auto-piqueurs pour dosage de la glycémie. **(Broutin et al., 2006)**

***Usage de drogues injectables**

Les expositions parentérales lors d'actes non médicaux (partage de seringues ou du matériel de préparation des injections chez les utilisateurs de drogue par voie veineuse.) jouent un rôle dans la transmission dont l'importance varie d'un pays à l'autre.

Ce mode de contamination s'est développé à la fin des années 1960 dans une population jeune à prédominance masculine **(Broutin et al., 2006)**

***Transmission verticale**

La transmission mère-enfant a été bien démontré mais le risque est faible et ne représente que quelques centaines de nouveaux cas par an. Il a été estimé 4 à 7 % par grossesse en cas de virémie. Le risque de transmission augmente en cas de coïnfection de la mère par le VIH ou en cas de virémie élevée, même en l'absence de coïnfection. L'allaitement n'apparaît pas comme un risque supplémentaire de transmission du VHC et n'est donc pas contre-indiqué. **(Desenclos, 2003 ; Broutin et al., 2006)**

*** transmission sexuelle**

La transmission sexuelle, qui a fait l'objet de nombreuses études, est possible, mais demeure rare . Quand ce mode existe, il est alors lié à des rapports sexuels associés à un saignement, en particulier des rapports génitaux-anaux ou à une infection sexuellement transmissible. **(Broutin et al., 2006)**

Le virus n'est pas transmis lors des contacts de la vie courante. Cependant, et bien que non documentée, sa transmission pourrait avoir lieu au sein d'un foyer, en cas d'utilisation par une personne indemne, d'objets (rasoir, ciseaux, brosse à dent, coupe-ongles, limes...) ayant été utilisés précédemment par une personne virémique. **(Broutin et al., 2006)**

Enfin, sont souvent évoqués le piercing et les pratiques de tatouages. Les données sont peu nombreuses sur ce sujet mais cette voie de transmission, par analogie à celle ayant lieu lors des soins, est tout à fait envisageable dès lors que le matériel utilisé n'est pas stérilisé entre les sujets tatoués ou « percés ». **(Broutin et al., 2006)**

I.6.Le diagnostic

Le diagnostic des infections par le VHC repose, comme celui de toute infection virale, sur deux types de tests : les tests indirects, qui mettent en évidence les anticorps dirigés spécifiquement contre le virus, tests sérologiques, et les tests directs, qui mettent en évidence des constituants de la particule virale principalement des tests de biologie moléculaire permettant l'étude de l'ARN du VHC. **(Lunel et al., 2003)**

I.6.1 Test sérologiques

Il s'agit habituellement de tests ELISA (enzyme-linked immuno-sorbent assay).de troisième génération, consistent à rechercher, par capture, les anticorps IgG circulants à l'aide des peptides et/ou protéines recombinants. Codés à la fois par les régions structurales, capsidique, et pour certains tests, enveloppe, et les régions non structurales (NS3, NS4 et NS5). **(Lunel et al., 2003)**

La sensibilité de l'ELISA est proche de 100 % chez les immunocompétents mais peut être faussement négative ou positive chez les immunodéprimés et au cours des maladies auto-immunes. Cependant, un anti-VHC positif ne renseigne pas sur le caractère aigu ou chronique de l'infection et encore peut être faussement positif. Pour cela, il est indispensable de réaliser un test de confirmation par la recherche d'acide nucléique. **(Lunel et al., 2003)**

I.6.2. Testes moléculaire :

Le diagnostic direct repose sur la détection qualitative de l'ARN viral par amplification d'une région cible de ce génome. Il est indiqué à la suite de la découverte d'une sérologie positive, après suspicion d'une hépatite aiguë avec une sérologie négative ou chez les patients hémodialysés ou immunodéprimés en cas de suspicion d'une hépatite chronique sans anticorps détectables. **(Moradpour et al., 2007)**

Ces méthodes d'amplification par PCR (polymerase chain reaction) en temps réel sont sensibles avec un seuil de détection de 12 à 15 UI/mL. Elles permettent d'évaluer le degré de répllication du virus de l'hépatite C. **(Marcellin et al., 2007)**

ChapitreII

Matériel et méthodes

II.1. Matériel

Une étude rétrospective a été réalisée durant la période du stage, elle porte sur 189 patients atteints d'hépatites C et recrutés au niveau de différents centres hospitaliers d'Alger, les patients ont été adressés au laboratoire de virologie de l'Institut Pasteur d'Alger (IPA) pour une quantification de la charge virale dans le cadre d'un bilan pré-thérapeutique ou d'un suivi de traitements.

Le recueil des données a concerné la période allant de janvier à décembre 2016, à partir des registres des patients et des fiches de renseignements et en prenant en considération l'âge, le sexe et la région du patient.

II.1.1. Matériel biologique

Les prélèvements sanguins ont été effectués dans les différents établissements hospitaliers. Le sang est récupéré dans des tubes secs ou contenant de l'EDTA. L'échantillon est centrifugé pour la récupération des sérums qui sont directement acheminés vers l'IPA. Les sérums recueillis ont été conservés, jusqu'à leur utilisation, soit à 4°C pour une durée de 72 heures ou congelés à -20°C pour une durée plus longue, tout en évitant la congélation et la décongélation répétée.

II.2. Méthodes

Dans cette étude, deux types de tests destinés pour le diagnostic et le suivi virologique des infections liées au VHC ont été utilisées :

II.2.1. Méthodes de détection des anticorps anti-VHC

La détection des Acs anti- VHC au niveau sérique a été réalisée par deux méthodes de dosage immunologiques, la technique microparticulaire par chimiluminescence (CMIA) et le test immuno-enzymatique (ELISA) : (ELISA1 pour BioRad , ELISA2 pour wantai)

II.2.1.1. Technique microparticulaire par chimiluminescence

Son principe repose sur l'utilisation d'une microparticule recouverte d'antigènes purifiés du VHC pour la détection qualitative des Acs-anti VHC dans le sérum du patient; la formation du complexe immun Ag-Ac est révélée par un anticorps monoclonal anti-IgG humaines couplés à l'acridinium (conjugué), ce dernier sous l'effet d'une activation chimique émet un signal chimiluminescent dont la quantité est proportionnelle à la quantité des Acs-anti VHC dans le sérum. Le kit Architect anti-VHC 6C37[®] est utilisé pour ce dosage (**Annexe III**).

En effet, La réaction chimiluminescente résultante de la formation du complexe Ag-Ac est mesurée en unités relatives de lumière (URL). Il existe une relation directe entre la quantité d'anticorps anti-VHC dans l'échantillon et l'URL détecté par le système optique de l'automate Architect isystem[®].

La présence ou l'absence d'Acs anti-VHC dans l'échantillon est déterminé en comparant le signal chimiluminescent de la réaction au signal d'une valeur seuil déterminée à l'aide d'une courbe de calibration. Le résultat s'exprime en ratio(S/CO) exprimant l'URL de l'échantillon /l'URL seuil.

L'interprétation des résultats est basée sur le ratio S/CO suivant les recommandations du fabricant résumé en **tableau II**. Les valeurs inférieures à 1 sont considérées négatives tandis que celles supérieures ou égales à 1 sont retenues positives pour les anticorps anti-VHC.

Tableau II. Interprétation des valeurs S/CO pour la méthode CMIA

Résultat S/CO	Interprétation
<1,00	Négatif
≥1,00	Positif
S/CO = 0,9-1,1	indéterminé et nécessite un autre test de confirmation

II.2.1.2. Technique immuno-enzymatique ELISA wantai

C'est une technique immuno-enzymatique indirecte, elle permet la détection des anticorps totaux IgM, IgA, IgG.

Dans cette technique les antigènes recombinants du VHC (protéines structurales de la capsid et non structurales NS3, NS4 et NS5, exprimés dans *Escherichia coli*) sont immobilisés sur la paroi des puits d'une microplaque dans laquelle les sérums sont distribués.

Après un temps d'incubation, un lavage est effectué pour éliminer les protéines et les Acs non fixés suivi par l'ajout de l'Ac de révélation, le conjugué HRP couplé à la peroxydase. Après une période d'incubation, un deuxième lavage est réalisé pour éliminer le conjugué enzymatique non lié (**Annexe IV**).

La révélation des Acs se fait par l'ajout du substrat enzymatique (H_2O_2) et le chromophore ce qui mène, après l'action catalytique de la peroxydase, à la formation d'un composé coloré et quantifiable par mesure de la densité optique (DO) (**Figure 10**).

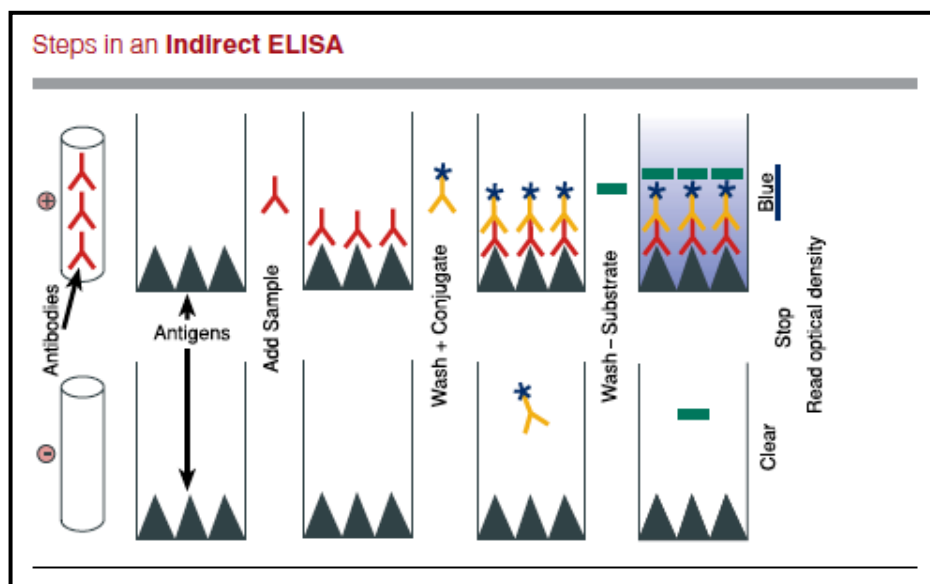


Figure 10. Représentation schématique générale du principe d'ELISA

En plus des échantillons, des puits pour le blanc et des sérums du contrôle positif et négatif sont ajoutés à la série d'analyse pour la validation du test. En se basant sur la densité optique, le test est valable si :

- la DO du blanc < 0,080 à 450 nm
- la DO du contrôle négatif < 0,100 à 450 /360nm
- la DO du contrôle positif > 0,800 à 450/630 nm

L'interprétation des résultats est effectuée en comparant les valeurs de la DO obtenue pour chaque échantillon contre une valeur dite valeur seuil (VS). Cette dernière est calculée par l'équation suivante :

$$V_s = \text{moyenne des contrôles négatifs} + 0,12$$

Suivant les recommandations du fabricant résumé en **tableau III**, le rapport du DO de chaque échantillon/la valeur seuil du test (Do/V_s) oriente vers un résultat positif, négatif ou douteux qui nécessite une confirmation par un autre test sur un autre prélèvement.

Tableau III. Interprétation des résultats pour la méthode ELISA Wantai

Do/Vs	Interprétation
$Do /V_s < 1$	Négative
$Do/V_s \geq 1$	Positive
$Do/V_s = 0,9-1,1$	Douteux

II.2.2. Méthodes de mise en évidence et de quantification du génome viral

Les prélèvements sériques confirmés positifs pour les anticorps anti-VHC par les tests sérologiques ont été quantifiés par la technique de RT-PCR (Reverse transcriptase Polymérase Chain Réaction) quantitative en temps réel.

Dans cette étude le test utilisé est une RT- PCR sur l'analyseur COBAS®TaqMan®VHC, un test quantitatif dont le but est l'amplification de l'acide nucléique pour la quantification de l'ARN de virus de l'hépatite C dans le sérum ou le plasma.

II.2.2.1. RT-PCR sur COBAS®

Ces tests sont complètement automatisés, la préparation des échantillons est faite au moyen de l'appareille COBAS® AmpliPrep, l'amplification et la détection de l'acide nucléique sont automatisés au moyen de l'analyseur COBAS®AmpliPrep ou COBAS®TaqMan® qui est constitué d'un thermocycleur associé à un système de la fluorescence. Les étapes de la préparation et de l'analyse sont interfacées sur un ordinateur à l'aide du logiciel AMPLILINK qui permet la programmation et le contrôle des expériences, ainsi de stocker et exploiter les données.

- **Principe**

Deux amorces sont nécessaires à l'amplification (une amorce sens et une amorce anti sens). Pour la PCR en temps réel, on ajoute un oligonucléotide en même temps que les

amorces. Cet oligonucléotide est complémentaire d'une séquence interne du fragment d'ADN à amplifier située entre les deux amorces (appariement de l'oligonucléotide et des deux amorces au cours de l'étape d'hybridation).

Dans le test TaqMan l'amorce joue le rôle d'une sonde, elle est doublement marquée en 5' par le reporter et en 3' par le quancher. Cette technologie profite du fait que la Taq polymérase utilisée dans les PCR possède une activité exonucléasique lors de la transcription du brin complémentaire.

En effet, quand la sonde se fixe sur la séquence cible, on n'observe toujours pas de fluorescence, car le quancher se trouve spatialement proche du reporter, et va absorber l'énergie du Reporter et la transformer en chaleur pour la plupart du temps. Cependant durant l'étape de l'élongation de la PCR la Taq polymérase arrive à la sonde pour synthétiser le nouveau brin, elle détruit la sonde et relargue donc le reporter dans la solution. Il est alors suffisamment éloigné du quancher pour émettre une fluorescence. C'est une technique dite de sonde d'hydrolyse, qui a le désavantage de lyser les sondes qui ne sont donc plus réutilisables pour le cycle suivant (**Figure11**).

L'intensité du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés. Durant la réaction de PCR, le logiciel AMPLILINK offre l'avantage de suivre l'amplification à chaque cycle, mais aussi le traitement du signal et des résultats.

- **Mode opératoire**

Le test quantitatif COBAS Ampliprep /TaqMan VHC repose sur trois opérations principales : la préparation des échantillons dans le but d'isoler l'ARN du VHC, la transcription inverse de l'ARN cible pour produire l'ADN complémentaire (ADNc) et l'amplification par PCR de l'ADNc cible en même temps que la détection du signal émis par les sondes clivées (**Figure11**).

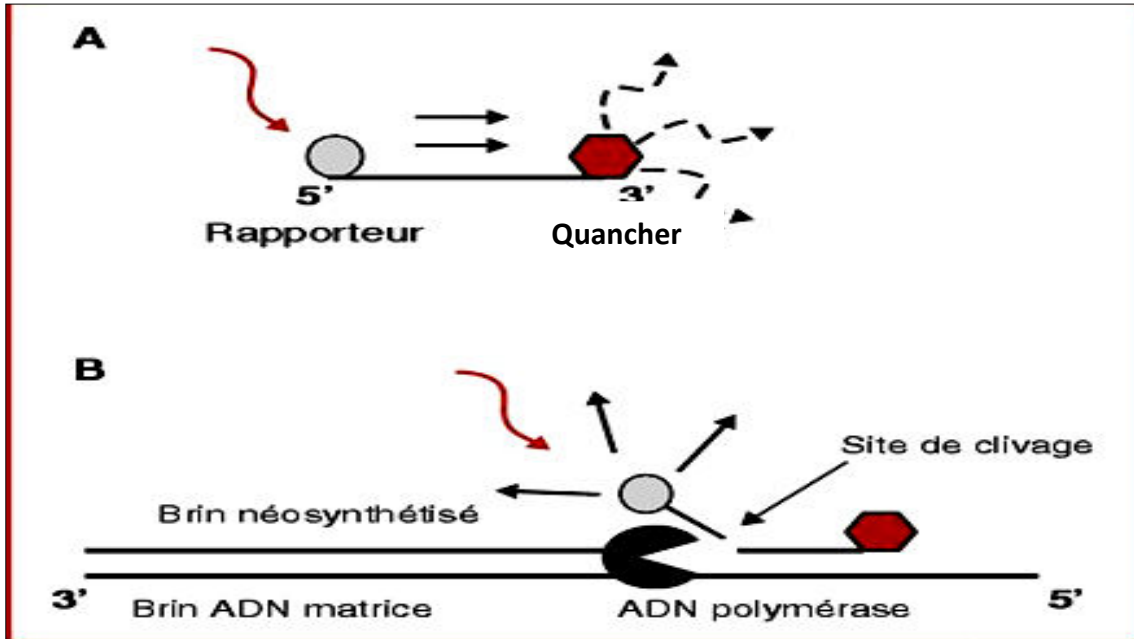


Figure 11. Principe de détection des produits d'amplification par PCR utilisant la méthode TaqMan®. (Candotti et al., 2007)

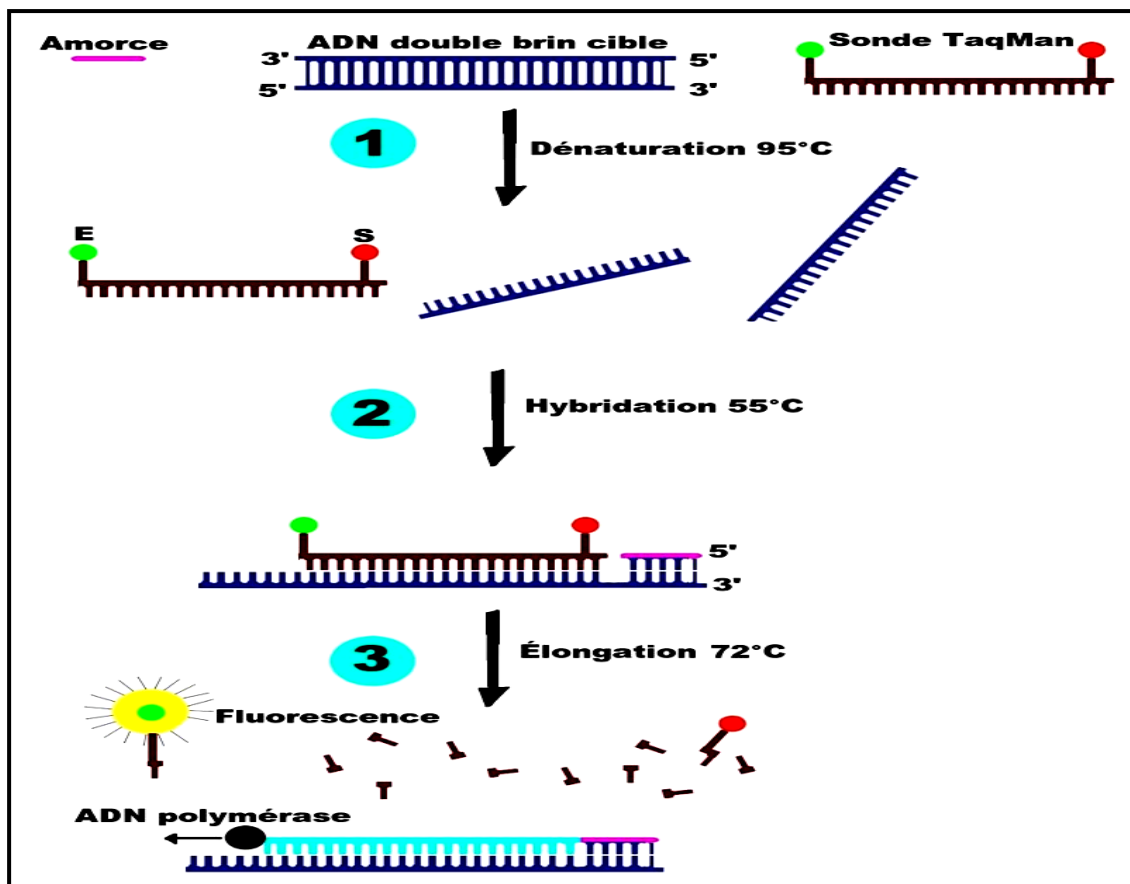


Figure 12. Principe de la PCR quantitative en temps réel avec sonde TaqMan

➤ **Préparation des échantillons**

Le test quantitatif COBAS®AmpliPrep/COBAS®TaqMan®VHC recourt à la préparation automatisée des échantillons sur l'appareil COBAS Ampliprep à l'aide d'une technique générique de capture basée sur silice. Le volume nécessaire pour le test est de 650 µl de plasma ou du sérum. La préparation passe par les étapes suivantes :

- les particules du virus du VHC sont lysées par incubation à une température élevée à l'aide d'un tampon chaotrope de lyse et d'une protéase qui libère des acide nucléique et protège l'ARN du VHC libéré contre les RNases présentes dans le sérum.
- l'introduction de la protéase et une quantité connue d'ARN du contrôle interne (QS) du VHC dans chaque échantillon avec le réactif de lyse et des particules magnétique en verre.
- la liaison de l'ARN du VHC et l'ARN du QS du VHC à la surface des particules magnétiques en verre.
- Après des étapes de lavage, les acides nucléiques adsorbés sont élués à température élevée dans une solution aqueuse.
- L'échantillon traité, contenant l'ARN du VHC et l'ARN du QS du VHC libéré est ajouté au mélange d'amplification qui constituée de dNTP, amorces, sondes et de polymérase recombinante thermostable. Par la suit, un volume réactionnelle de 100 µl est transféré dans chaque tube d'amplification avec une capacité de 48 puits, le tout est déposés sur un support appelé le k carrier. Ce dernier est transféré manuellement à l'analyseur.après cette étape, aucune intervention humain est nécessaire.

➤ **Amplification**

Le test quantitatif COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan HCV s'appuie sur la transcription inverse de l'ARN du HCV pour produire de l'ADN complémentaire (ADNc) et sur l'amplification par PCR de l'ADN. Ces deux étapes sont réalisées au moyen d'un mélange optimisé d'enzyme thermostables recombinantes ; l'ADN polymérase Z05 et Z05D.

En présence de manganèse (Mn 2+) et dans des conditions tampon appropriées, la Z05 et Z05D ont à la fois une activité de transcriptase inverse et d'ADN polymérase .Cela permet à la transcription inverse et à l'amplification par PCR de se produire en même temps que la détection en temps réel des amplicons. L'étape de la transcription inverse et à l'amplification se déroulent comme suit :

- La dénaturation de l'hybride ARN/ADNc par la maintenance de mélange réactionnel sous l'effet de la température élevée.
- Lors de refroidissement du mélange l'hybridation des amorces et de la sonde à l'ADN complémentaire aura lieu.
- La production de l'amplicon se fait grâce aux ADN polymérases stable Z05 et Z05D qui permettent l'extension des amorces hybridées le long des matrices. L'amplification n'a lieu que dans la région du génome du VHC située entre les amorces.
- L'opération est répétée pendant un nombre défini de cycle, programmé au préalable dans l'analyseur.

➤ **Interprétation des résultats**

A la fin de la PCR, le logiciel AMPLILINK, représente graphiquement les résultats de l'amplification et de la quantification, ceux-ci se présentent sous forme de graphiques illustrant l'évolution de la cinétique d'accumulation de la fluorescence au cours des cycles d'amplification. L'évolution de cette cinétique prend l'allure d'une courbe sigmoïde où se distinguent trois phases (**Figure13**) :

- Phase d'initiation (phase de bruit de fond) ; la quantité de fragment amplifié est insuffisante pour générer un signal fluorescent
- Phase exponentielle ; elle est caractérisée par la visualisation de l'augmentation de la fluorescence ou la quantité de produit de PCR obtenue est directement proportionnelle à l'intensité de la fluorescence.
- Phase plateau (phase de saturation) ; certains composants de la réaction deviennent limitant et le système ne permet plus une amplification exponentielle.

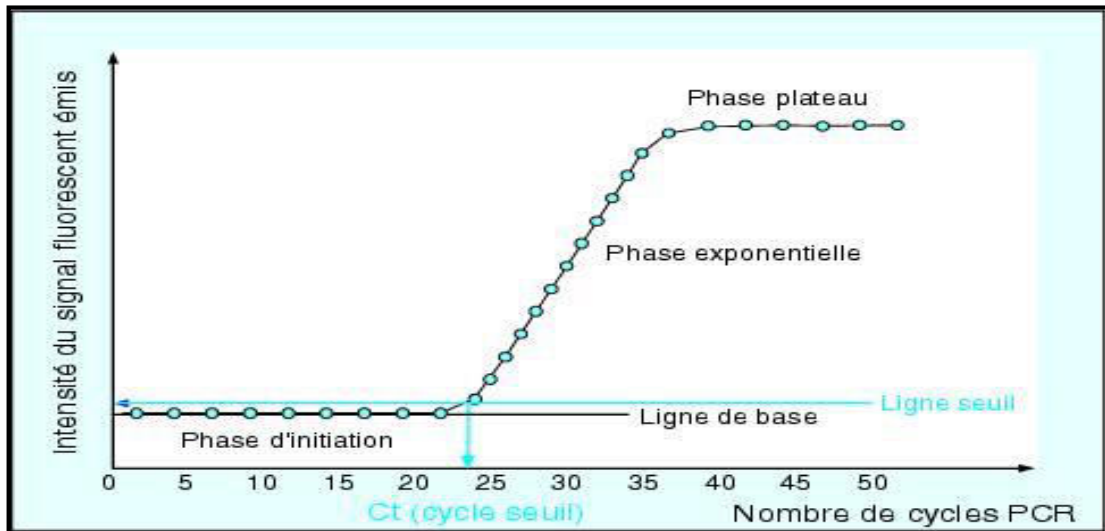


Figure 13. Suivi de la cinétique d'une réaction de PCR en temps réel (Tse et Capeau.,2003)

II.3 Etude statistique

La comparaison des résultats de différents tests sérologiques et le test de la PCR est effectuée par le test d'indépendance Khi-2.à l'aide d'un logiciel (statistica version 8)

Chapitre III

Résultats et discussion

3.1. Résultats des données épidémiologiques

3.1.1. Répartition des patients selon le sexe

Comme représenté dans la **figure 14** notre étude a porté sur un échantillon de 189 patients adressés au niveau du laboratoire des hépatites virales –IPA pour réaliser le test de la charge virale VHC. La population étudiée montre une légère prédominance féminine qui représente un pourcentage de 64,02% devant un pourcentage de 35,97% enregistré pour les hommes, soit un ratio de 1.74. Cette prévalence féminine est décrite dans certaines études précédentes Nottamment celles de **Dalibon., 2016**.

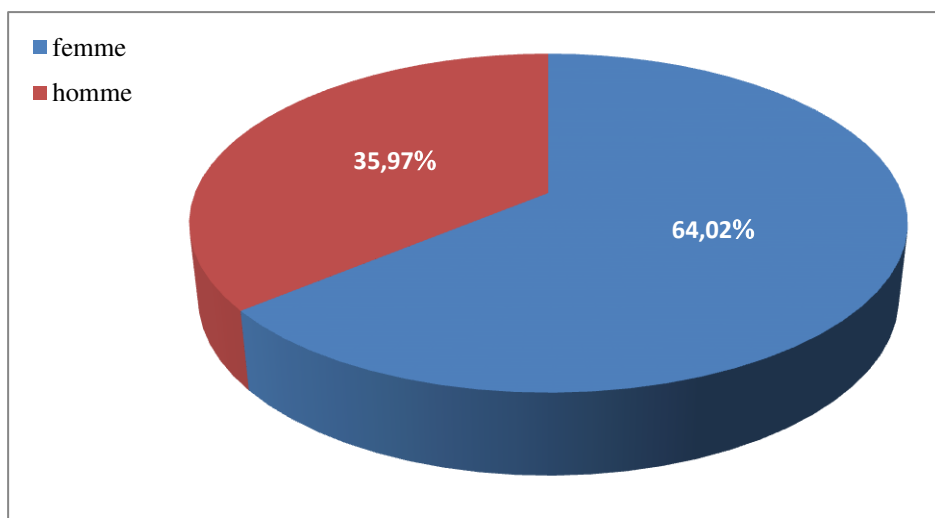


Figure 14. Répartition des patients selon le sexe.

3.1.2. Répartition des patients selon la tranche d'âge

L'âge des patients est compris entre (1-88 ans) avec un âge moyen de 49 ,32 ans. Nous avons étudié également la répartition des patients selon l'âge en les répartissant en 8 tranches d'âge différents (**Figure 15**), les patients dans les tranches d'âgés de 23 ans jusqu'à 66 ans était les plus orientés pour faire le test de charge virale avec un optimum de 25% pour la tranche allant de 56-66 ans. Cette répartition reflète que la catégorie d'âge jeune-adulte de 23 à 55 ans, si on additionne les pourcentages relatifs de chaque classe, est la plus touché par cette infection virale.

D'après les résultats obtenus, la demande d'une quantification de charge virale VHC par PCR augmente avec l'âge. Dans les pays les plus touchés, en Afrique notamment, la prévalence augmente avec l'âge à partir de la fin de l'adolescence, indiquant un risque cumulé avec l'âge.

Cette augmentation est due d'une part à la persistance des anticorps chez les sujets immunocompétentes et d'autre part d'un risque de contamination éventuelle pendant toute la vie (**Madhava et al ., 2002 ; Desenclos ,2003**).

Selon **Brenard et al ., 2003** l'infection chronique par le VHC est souvent vu tardivement parce qu'elle est asymptomatique et donc silencieuse ; les personnes infectées peuvent rester sans symptômes pendant plus de 10 à 20 ans . Ceci explique la découverte de l'infection à l'âge adulte notamment entre 40 et 59 ans.

Il est cependant intéressant de remarquer qu'à partir des résultats indiqués dans notre étude un seul enfant confirmé positif, ce qui signifie que la prévalence de l'infection à VHC est faible chez l'enfant et augmente chez les adultes jeunes (**Madhava et al .,2002**) .

Cette faible proportion peut s'expliquer par le fait de faible fréquence de transmission materno-fœtale (5%) et la faible exposition aux autres modes de transmission à cet âge (**Desenclos et al., 1994**).

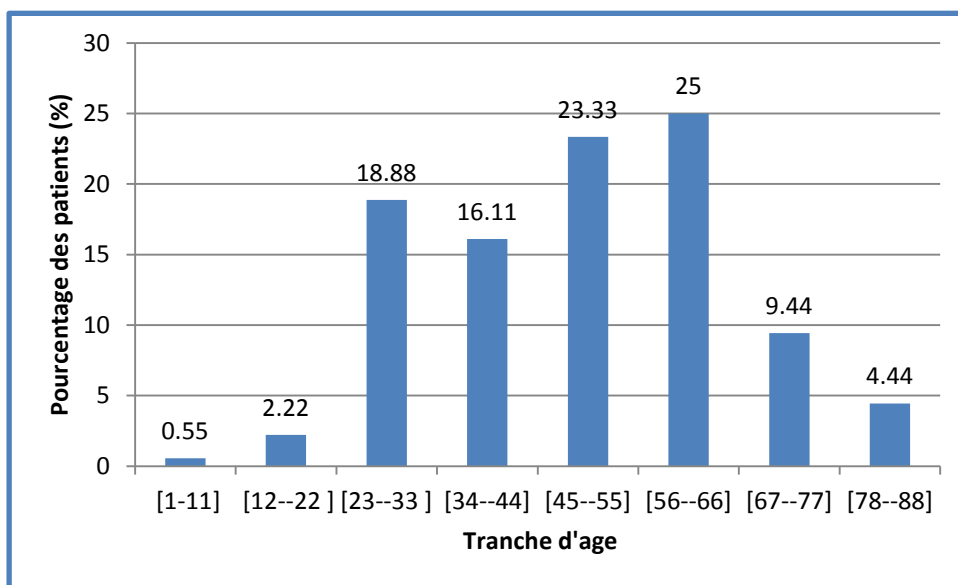


Figure 15. Répartition des patients en fonction des tranches d'âge.

3.1.3. Répartition des patients selon la région

Nous avons étudié la provenance des patients en les classant selon les 4 régions (Sud, Nord, Est et Ouest algérien), les résultats sont représentés dans **la figure 16**. La région du centre est la plus touchée où 35% des patients proviennent de cette région de, suivie par la région de l'est (30%) puis l'ouest (24,13%) , tandis qu'une minorité des patients sont du sud.

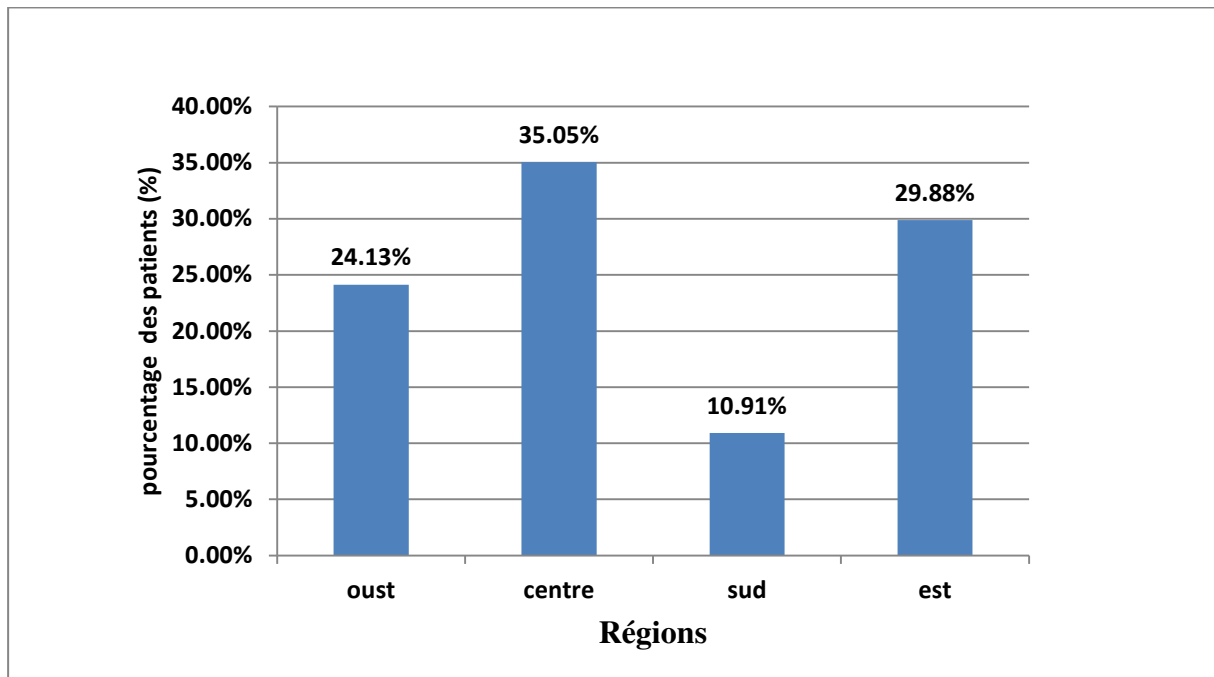


Figure 16. Répartition des patients en fonction de la région.

A partir de ces résultats; on a remarqué que la plus part des patients sont regroupés au niveau du centre ceci est probablement dû au fait que ces régions sont représentées par la capitale et les régions proches et donc la disponibilité des hôpitaux, des spécialistes et surtout la proximité pour leur prise en charge facilite leur recrutement.

3.2. Résultats des tests immunologiques et de la PCR

La première partie de notre étude s'effectue en pratiquant une sérologie sanguine, test de détection des Anticorps anti-VHC. Cette sérologie est basé sure 3 techniques (CMIA, ELISA-1 ,ELISA- 2). La positivité de ce test signifie la présence d'anticorps anti VHC, témoigne d'un contact avec le virus de VHC mais pas forcément sa présence se qui nécessite un deuxième test moléculaire, la PCR.

D'autre part un test de dépistage négative d'anticorps anti-VHC, signifie une absence de contact avec le virus sauf en cas d'infection récente, les anticorps n'étant pas encore apparus ou en cas d'immunodépression sévère.

Le test de première intention utilisé est la CMIA ; les résultats faiblement positifs sont repris sur un deuxième prélèvement par un test ELISA-1 et ELISA-2. S'il ya une concordance entre les trois tests, le résultat est retenu (positif ou négatif). Au contraire, s'il ya une discordance entre les trois résultats une PCR pour la recherche de l'ARN viral est obligatoirement recommandée pour confirmer le résultat sérologique.

Dans notre étude, nous avons fixé comme objectif de comparer les techniques utilisées, tout en mettant en exergue l'intérêt de la PCR dans ce diagnostic en confirmant ou non le résultat obtenu par les techniques immunologiques. Les effectifs observés, ainsi les pourcentages relatifs à chaque sont représentés test dans **le tableau Iv**.

Tableau Iv. Effectif et pourcentage relatif des résultats sérologiques et de la PCR

Résultats sérologiques	CMIA	ELISA-1	ELISA-2	Résultat de la PCR
Positif	172 (91%)	119 (62%)	142 (75,13%)	20 (10,58%)
Négatif	17 (8,99%)	70 (37,03%)	47 (24,86%)	169 (89,41%)
Total	189	189	189	189

Sur les 189 sérums analysés par un le test immunologique CMIA, 172 sérums ont été positifs soit un pourcentage de 91% tandis que 8,99% ont été considérés comme négatifs.

Les mêmes sérums analysés pour la deuxième fois par la technique immunoenzymatique ELISA-1 enregistrent 62% de positivité et 37,03 % de sérums négatifs. Cette indépendance entre les deux techniques confirmé par le test statistique (Annexe vI) révèle une différence de la spécificité et de la sensibilité entre les deux techniques, où la CMIA demeure la moins spécifique. Cette constatation est aussi valable en comparant la CMIA avec le test ELISA-2 qui détermine dans notre population un pourcentage de 75,13% des sérums positifs et 24,86% négatifs.

Pour confirmer le résultat obtenu par les techniques immunologiques nous avons analysé l'ensemble des sérums par PCR pour déterminer la concentration de l'ARN viral, proportionnelle à sa charge et qui diffère entre la présence du virus (cas positif) ou un contact ancien ou récent avec l'VHC.

Les résultats de ce test moléculaire montrent que seule 10,58% sont des sérums vrais positifs alors que le 89,41% sont des sérums négatifs ou des faux positifs.

3.3. Etude de la discordance entre les tests immunologiques et la PCR

Les 189 sérums censés être positifs pour les Ac anti-VHC ont été étudiés par les 3 techniques immunologiques (CMIA, ELISA-1 et ELISA-2) puis repris par la technique moléculaire PCR

(RT-PCR). Sur les 189 sérums, 4 cas de discordance commune entre les 4 techniques utilisées ont été révélées (**Tableau V**).

Parmi les 4 sérums positifs en ELISA-1, 3 étaient négatifs et un seul cas était vrai positif par ELISA-2 et qui a démontré une charge virale détectable ou positive par la PCR. Ces aboutissements peuvent montrer clairement, d'une part l'intérêt de la PCR dans la détermination des cas faux positifs et de l'autre part révèle l'efficacité de l'ELISA-2 comme technique immunologique donnant des résultats identique à ceux de la PCR dans ces cas de discordance.

Tableau V Discordance entre les résultats immunologiques et la PCR

CMIA	ELISA 1	ELISA 2	PCR
négatif	positif	négatif	négatif
négatif	positif	négatif	négatif
négatif	positif	positif	positif
négatif	positif	négatif	négatif

3.4. Discussion générale

Il est clairement établi que la détection des AC anti VHC par une technique sensible et spécifique est primordiale lors du suivi des patients atteints de l'hépatite C. Le test de diagnostic le plus utilisé est la recherche des anticorps dirigés contre les protéines virales par méthode indirecte, notamment ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) de troisième génération dont la spécificité est de l'ordre de 99% et la sensibilité chez des patients porteurs du virus C, au moyenne est plus de 99%. La sensibilité des tests de troisième génération semble satisfaisante chez les hémodialysés et les sujets infectés par le VIH en dehors d'immunodépression. (**LUNEL-FABIANI, et al ., 2003 ; Bahadi et al ., 2013**).

Dans le cadre de notre étude, la nécessité d'effectuer deux tests ELISA différentes pour le diagnostic a révélé son intérêt, le deuxième test ELISA-2 est recommandé quand le premier donne un résultat faiblement positif ou bien lorsque le résultat est négatif mais la densité optique est très élevée et se rapprochant beaucoup plus d'un résultat positif. Sur les 17 sérums négatifs au test CMIA 13 ont été trouvés négatifs par le test ELISA-2. Ces résultats confirment la spécificité de l'ELISA-2 et corroborent avec les résultats retrouvés par la PCR

et dans la littérature qui indique le caractère spécifique et sensible de l'ELISA de troisième génération.

Malgré que la sensibilité des tests ELISA est très forte, les cas d'un faux négatif ou faux positif augmentent chez les patients immunocompétents et au cours des maladies auto-immunes. Pour cela, il est indispensable de réaliser un test de confirmation par la recherche d'acide nucléique. **(Bahadi et al .,2013)**. En effet, Les patients hémodialysés, à cause de dialyses répétées, et les patients transplantés rénaux sous traitement immunosuppresseur, ont une capacité de synthèse d'anticorps diminuée ; c'est-à-dire de patients ayant une PCR positive avec un taux d'anticorps bas. Par ailleurs, des cas de séroréversion, définie par la disparition des anticorps anti-VHC détectés dans le sang malgré une virémie persistante, ont été décrits chez les patients hémodialysés et les transplantés rénaux. La PCR reste donc la technique la plus sûre pour détecter une virémie chez ces patients, **(Pivert et al ., 2004)**.

La corrélation entre les taux d'anticorps et la présence d'ARN viral chez les patients co-infectés par le VIH reste encore incertaine. Cette corrélation ne peut être validée en raison d'un effectif trop faible donc peu représentatif. De plus, ces patients pour la plupart immunodéprimés peuvent avoir une réponse sérologique faible voire nulle malgré une hépatite C chronique **(Pivertet et al., 2004)**.

Il a été aussi suggéré qu'une forte relation existe entre les anticorps anti-VHC et la présence d'ARN pour un ratio supérieur ou égal à 3, avec un test Elisa différent de celui que nous avons utilisé **(Pivert et al ., 2004)**. Toutefois, de telles analyses de détection des anticorps spécifiques anti-VHC sont mises en défaut au cours des premières phases de l'infection par le VHC du fait d'un délai d'apparition de ces anticorps d'environ deux mois. Cette situation est particulièrement critique en cas d'immunodépression des patients, contexte où les anticorps peuvent être à des taux particulièrement bas ou inexistantes **(Schnuriger et al ., 2006)**.

Pour les patients hémodialysés, transplantés rénaux ou co-infectés par le VIH et de façon plus générale pour l'ensemble des patients immuno-déprimés, le diagnostic d'une hépatite C chronique impose la réalisation d'un test qualitatif de détection de l'ARN du VHC par PCR **(Pivert et al ., 2004)**.

Conclusion générale

Conclusion :

Un diagnostic d'hépatite C précoce permet d'éviter les problèmes de santé que peut entraîner l'infection et de prévenir la transmission du virus.

Les techniques de diagnostic de l'hépatite C sont de deux types. Les tests de détection des anticorps anti-HCV et les tests moléculaires sont classés en deux catégories: les tests de dépistage (EIA) conçus pour détecter tous les individus ayant eu un contact avec le HCV. Ils sont de plus en plus performants sur le plan de la sensibilité et de la spécificité et les tests de confirmation de l'infection utilisant les techniques de biologie moléculaire (la technologie de PCR en temps réel) ils permettent de détecter les acides nucléiques viraux (ARN-HCV). Aujourd'hui c'est l'outil de choix qui permet de quantifier le génome viral du HCV. Ses performances peuvent se résumer en quatre mots : spécificité, sensibilité, bonne reproductibilités.

La trousse de quantification de l'ARN HCV (Cobass Ampliprep/Cobass Taqman) actuellement disponible au laboratoire des hépatites au sein de l'IPA, qui présente d'excellente analytique. elle permet une quantification exacte de forte charge virale.

Il faut ajouter également à leurs nombreuses qualités, la rapidité de ces techniques de PCR en temps réel sans nécessité d'une étape post – PCR. la méthode est automatisable, et par conséquent parfaitement adapté a une analyse de routine, elle permet d'obtenir des résultats au moins de 24 heures à l'opposé de la PCR conventionnelle qui nécessitait un délai de 3jours. par ailleurs, la réaction s'effectuant en tube fermé, le risque de contamination est faible.

Références bibliographiques

Les références bibliographiques

Asselah, Tarik, et al. "Variabilité génétique du virus de l'hépatite C: implications cliniques." *Gastroenterol Clin Biol* 24 (2000): 175-84.

Bahadi A, Maoujoud O, Zejjari Y , et al . Diagnostic et évaluation de l'hépatite virale C chez l'hémodialysé. *La Revue de Santé de la Méditerranée orientale* 19(2013) :192-199.

Bartenschlager, Ralf, Volker Lohmann, and Francois Penin. "The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection." *Nature Reviews Microbiology* 11.7 (2013): 482-496.

Bukh, Jens. "The history of hepatitis C virus (HCV): Basic research reveals unique features in phylogeny, evolution and the viral life cycle with new perspectives for epidemic control." *Journal of hepatology* 65.1 (2016): S2-S21.

Burstow, Nicholas J., et al. "Hepatitis C treatment: where are we now?." *International journal of general medicine* 10 (2017): 39.

Brenard R, Michielsen P, Bourgeois N , De Galoesy et al. Hépatite C : dépistage, traitement et prévention .Recommandation pratiques-résumé. *LA Revue de Médecine Générale* n°205 septembre 2003; 312-7.

Broutin, S., et al. "Histoire naturelle et diagnostic de l'hépatite C." *Journal de Pharmacie Clinique* 25.1 (2006): 49-56.

Candotti, D. et J-P. Allain . Tests d'amplification génomique multiple pour le dépistage des infections virales : développement et applications. National Blood Service, Long Road, Division of Transfusion Medicine, Department of Haematology, University of Cambridge, Cambridge CB2 2PT, Grande-Bretagne 11.2(2007) :135-50.

Chisari, Francis V. "Unscrambling hepatitis C virus–host interactions." *Nature* 436.7053 (2005): 930-932.

Choo QL, KUO G, Amy J et al . Isolation of a cDNA Clone Derived from a Blood-Borne Non-A, Non-B Viral Hepatitis Genome . *science*, 1989 ;244 :359-362.

Dalibon, Pierre. "Diagnostic et clinique de l'hépatite C." *Actualités Pharmaceutiques* 55.552 (2016): 21-24.

Deleersnyder, V., A. Pillez, C. Wychowski, K. Blight, J. Xu, Y. S. Hahn, C. M. Rice and J. Dubuisson (1997). "Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes." *J Virol* 71(1): 697-704.

Desenclos, J-C. "L'infection par le virus de l'hépatite C dans le monde: importance en santé publique, modes de transmission et perspectives." *Virologie* 7.3 (2003): 177-191.

Einstein, A., B. Podolsky, and N. Rosen, 1935, "Can quantum-mechanical description of physical reality be considered complete?", *Phys. Rev.* **47**, 777-780.

Fournier, Claire, and Bernard Willems. "L'hépatite C chronique... une maladie curable!" *Le Médecin du Québec* 47.4 (2012).

Gale, Michael, and Eileen M. Foy. "Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus." *Nature* 436.7053 (2005): 939-945.

Gozlan J. Les nouveaux traitements de l'hépatite c . *Revue francophone des laboratoires* N°487 (2016) :65-73.

Halfon, P., and P. Cacoub. "Quantification virale du virus de l'hépatite C: présent et avenir." *La Revue de médecine interne* 21.2 (2000): 174-181.

Hajarizadeh, Behzad, Jason Grebely, and Gregory J. Dore. "Epidemiology and natural history of HCV infection." *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 10.9 (2013): 553-562.

Ha S, Totten S, Pogany L, Wu J, Gale-Rowe M. L'hépatite C au Canada et l'importance du dépistage fondé sur les risques. *Relevé des maladies transmissibles au Canada.* 42-3(2016) : 65-71.

Helle, F., and L. Cocquerel. "L'entrée du virus de l'hépatite C dans ses cellules cibles." *Virologie* 12.2 (2008): 105-116.

Hullegie, Sebastiaan J., et al. "Current knowledge and future perspectives on acute hepatitis C infection." *Clinical Microbiology and Infection* 21.8 (2015): 797-e9.

Lacroix, Noémie, et al. "Quelle place pour les tests rapides d'orientation diagnostique dans le dépistage de l'hépatite C chez les usagers de drogues?." *La Presse Médicale* 45.4 (2016): 431-437.

Lavillette, D., E. I. Pecheur, P. Donot, J. Fresquet, J. Molle, R. Corbau, M. Dreux, F. Penin and F. L. Cosset (2007). "Characterization of fusion determinants points to the involvement of three discrete regions of both E1 and E2 glycoproteins in the membrane fusion process of hepatitis C virus." *J Virol* 81(16): 8752-8765.

Lindenbach, Brett D., and Charles M. Rice. "Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function." *Nature* 436.7053 (2005): 933-938.

Lindenbach, Brett D., and Charles M. Rice. "The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly." *Nature Reviews Microbiology* 11.10 (2013): 688-700.

Lunel-Fabiani, Françoise, and Christopher Payan. "Outils virologiques dans le diagnostic et le suivi des hépatites C." *Gastroentérologie clinique et biologique* 27.8-9 (2003): 718-726.

Madan, V. and R. Bartenschlager (2015). "Structural and Functional Properties of the Hepatitis C Virus p7 Viroporin." *Viruses* 7(8): 4461-4481.

Madhava V , Burgess C , Drucker E. Epidemiology of chronic hepatitis C virus infection in sub-Saharan Africa . *Lancet Infect Dis* 2002 ;2 :293-302.

Marcellin P , Bonjour M, Boujenah J-L, Couzigou P , Degodet A, Jestin C ,Lang J-P, Larsan C et al . Hépatite C, Dépistage , clinique , prise en charge et conseils aux patients . 2007 ;312-332.

Mauss, Stefan, et al. *Short guide to hepatitis C*. Flying publisher, 2014.

Merle, Véronique, et al. "Facteurs de risque de contamination par le virus de l'hépatite C." (2008).

Miaillhes, P., and C. Trepo. "L'histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite c." *Médecine et Maladies Infectieuses* 30 (2000): S8-S13.

Moradpour, Darius, François Penin, and Charles M. Rice. "Replication of hepatitis C virus." *Nature Reviews Microbiology* 5.6 (2007): 453-463.

Nousbaum, J. B. "Les sous-types génomiques du virus de l'hépatite C: épidémiologie, diagnostic et conséquences cliniques." *Bulletin de la Société de pathologie exotique* 91 (1998): 29-33.

Op De Beeck, A., C. Voisset, B. Bartosch, Y. Ciczora, L. Cocquerel, Z. Keck, S. Fong, F. L. Cosset and J. Dubuisson (2004). "Characterization of functional hepatitis C virus envelope glycoproteins." *J Virol* 78(6): 2994-3002.

Payan, C., A. Raimbert, and I. Fouchard-Hubert. "Analyse quantitative des anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C (VHC): application au diagnostic d'infection chronique par le VHC." *Annales de Biologie Clinique*. Vol. 61. No. 3. 2003.

Pawlotsky, Jean-Michel. "New hepatitis C therapies: the toolbox, strategies, and challenges." *Gastroenterology* 146.5 (2014): 1176-1192.

Pawlotsky Jean-Michel. "Le virus de l'hépatite C." *médecine/sciences* 18.3 (2002): 303-314.

Pivert, A., et al. "Comparaison des cinétiques de l'ARN et de l'antigène de capsid du virus de l'hépatite C dans le suivi thérapeutique des patients co-infectés par le virus de l'hépatite C et le virus de l'immunodéficience humaine, traités par bithérapie interféron-ribavirine, dans le cadre du protocole RIBAVIC." *Pathologie Biologie* 52.9 (2004): 522-528.

Pol, Stanislas. "Virus de l'hépatite C-25 ans, la fin de l'histoire?." *médecine/sciences* 29.11 (2013): 998-1003.

Umar, Muhammad, et al. "Hépatite C: diagnostic, prise en charge et prévention." *Prévention* 11 (2013): 4.

Rehermann, Barbara, and Michelina Nascimbeni. "Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection." *Nature Reviews Immunology* 5.3 (2005): 215-229.

Schnuriger, A., et al. "Intérêt d'un nouveau test combiné antigène–anticorps pour le dépistage de l'infection par le virus de l'hépatite C: réduction de la fenêtre sérologique au cours de l'hépatite C aiguë chez le sujet co-infecté par le VIH." *Pathologie Biologie* 54.10 (2006): 578-586.

Sogni, P. "Les nouveaux traitements de l'hépatite C." *Images en dermatologie* 5.1 (2012): 27-29.

Stambouli, Oumaima. "Hepatitis C Virus: Molecular Pathways and Treatments." (2014).

Steinmann, E. and T. Pietschmann (2010). "Hepatitis C virus p7-a viroporin crucial for virus assembly and an emerging target for antiviral therapy." *Viruses* 2(9): 2078-2095.

Soussan,P . Le Pendeven ,C (2010). Virus de l'hépatite C. Service de virologie, Hôpital Tenon, 4, rue de Chine, 75020 Paris, France :1-19.

Tse,C. et J. Capeau (2003) . Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel.Hôpital Tenon, Laboratoire de biochimie et d'hormonologie, 4, rue de la Chine, 75020 Paris ; 61.3.

Von Hahn, T., J. C. Yoon, H. Alter, C. M. Rice, B. Rehermann, P. Balfe and J. A. McKeating (2007). "Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo." *Gastroenterology*132(2): 667-678.

Voisset, C. and J. Dubuisson (2004). "Functional hepatitis C virus envelope glycoproteins." *Biol Cell*96(6): 413-420.

Annexes

Annexe I

Matériel pour la détection des anticorps dirigés contre le VHC

Les consommables

- ✓ Gants à usage unique
- ✓ Embouts

Les équipements

- centrifugeuse
- vortex
- incubateur
- ASPIRATEUR automatique de microplaques
- Spectrophotomètre lecteur de microplaques
- Congélateur a -20c et Réfrigérateur
- Micropipettes réglables de 0 à 2000 μ l

Les solutions

- Eau de javel
- Eau distillée
- Alcool
- Solutions du lavage

Les réactifs

Origines et caractéristiques des différents produits utilisées pour l'étude sérologique utilisés au niveau de l'IPA.

Produit et fabricant	Présentation de produit	Principe de dosage	Nature de la phase solide	Nature de la phase liquide (conjuguée)	Le principe de la lecture du résultat
Architect anti-HCV 6C37	Plate-forme	Immuno-enzymatique microparticulaire (CMIA)	Antigènes recombinants : HCr43 ,c100-3	un conjugué chimilumine marquée à l'acridinium .	Mesure de la fluorescence par le système optique CMIA
Monalisa anti hcv plus version 3 (bio rad)	coffret	Immuno-enzymatique (EIA)	Antigènes recombinants :C NS3,NSII,NS4 , NS5	Anticorps de murins anti-IgG humaines marqués a la peroxydase	Mesure de la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450 /620nm
Wantai anti-HCV Plus	coffret	Immuno enzymatique (EIA)	Antigènes recombinants :C NS3,NS4 ,NS5	Anticorps anti-IgGM-IgG humaines marqués a la peroxydase	Mesure de la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450 /620nm

Matériel pour l'extraction, la retro transcription et la quantification du génome du VHC

Test de quantification de la charge virale

Tableau : Trousses de PCR en temps réel commerciales pour la détection et la quantification du génome viral de l'hépatite C , (Cobas TaqMan 48)

Test (PCR en Temps réel)	Fournisseur	Méthode	Limite inférieure de détection (UI / ml)	Interval de quantification (UI/ml)
Cobas Taq Man HCV 48	Roche Molecular diagnostics	PCR en temp réel (Cobas Taqman) après extraction automatisée par Cobas Ampliprep	15	15-69 000 000

Réactifs spécifique au COBAS ® AmpliPrep /COBAS® TaqMan HCV Analyser

1 . kit des réactifs :

-Réactifs de préparation des échantillons :

- Cassette du réactif des billes (HCVCS1) : billes =MGP dans l'isopropanol.
- Cassette du réactif de lyse (HCVCS2) : guanidine thiocyanate .
- Cassette des multi réactifs (HCVCS3) : (8% Protéase)+EB (tampon tris avec 0,2% methylparaben).
- Cassette des tests spécifique (HCVCS4) :contrôle interne QS +Mn2+ +MMx.

-Réactifs de contrôle :

- Témoin négatif (CTM(-)C).
- Témoin hautement positifs (HCVH(+))C).
- Témoin faiblement positifs (HCVL(+))C).
- Pince à code barre du témoin fortement positif.
- Pince à code barre du témoin faiblement positif.
- Pince à code barre du témoin négatif.

2. Matériels requis :

- portoir à échantillons
- Portoir à réactifs
- Portoir pour unités de traitement des échantillons
- couvercle pour tube K motorisé.
- couvercle pour tube K
- Portoir K
- Transporteur de portoir K
- porteur de portoir K

3. Articles jetables

- Unités de traitement des échantillons (SPUs)
- Tubes d'échantillon d'entrés (Tube S) à pince à code barre.
- portoir pour embouts K.
- porteur de portoir.

Annexe II

L'appareillage

- Architect anti HCV(pour le dépistage)
- Imprimantes couplée au CMIA
- Elisa de 3éme génération pour le contrôle de dépistage
- -COBAS AmpliPrep /COBAS TaqMan HCV Quantitative Test, version 2.0
- le logiciel Amplilink

Annexe III

Méthode

Nous avons utilisé deux types de tests pour le diagnostic et le suivi virologique des infections liées au virus de l'hépatite C (VHC) :

- ❖ Les tests sérologique (testes indirects) qui détecte les anticorps anti- VHC spécifique (CMIA et ELISA)
- ❖ Les testes moléculaire (tests directs) qui détectent et quantifient le génome virale (ARN) RT-PCR en temps réel .

Mode opératoire

Le dosage architect anti- HCV est un dosage immunologique en deux étapes :

Préparation des échantillons

- Le pipeteur ajoute les microparticules paramagnétique recouvertes d'antigène à l'échantillon dans la cupule réactionnelle .l'agitateur homogénéise le mélange réactionnel.
- Le mélange réactionnel incube et l'Ac présente dans l'échantillon se lie aux molécules de capture correspondantes(Ag) sur les microparticules pour former ainsi le complexe immun.
- un aimant attire les microparticules paramagnétiques sur une paroi de la cupule réactionnelle. Le distributeur de la zone de lavage lave le mélange réactionnel pour éliminer toutes particules non liées. Le traitement de l'échantillon peut alors se poursuivre.

L'unité de traitement

- le pipeteur distribue un conjugué chimilumine marqué à l'acridinium . Le conjugué se lie au complexe immun pour compléter le mélange réactionnel.
- le mélange réactionnel incube.
- le distributeur de la zone de lavage lave le mélange réactionnel pour éliminer toutes particules non liées.
- les solutions de préactivation (peroxyde d'hydrogène) et d'activation (hydroxyde de sodium) sont ajoutées au mélange réactionnel.
- lorsque le rapport S/CO est inferieur ou supérieur de 10 % à 1 sont considérés comme indéterminés et nécessite un autre test de confirmation

Annexe IV

Technique immuno-enzymatique ELISA 2

Mode opératoire de la technique :

1- Fixation des anticorps recherchés : des sérums contrôle (2 contrôle positif et 3 contrôle négatif) ainsi que le conjugué biotine et les échantillons sériques à analyser sont distribués dans les cupules de la microplaque en laissant la cupule A1 pour le blanc. Des anticorps anti –HCV sont présents, ils se lient aux antigènes de la phase solide. Un premier lavage est ensuite réalisé pour éliminer les anticorps non fixés.

2- fixation de l'anticorps de détection (conjugué): le conjugué HRP marqué à la peroxydase est ajouté dans chaque cupule sauf le blanc afin qu'il se fixe à leur tour aux anticorps à doser retenus sur la phase solide , Un deuxième lavage pour éliminer le conjugué enzymatique non lié.

3- révélation des anticorps fixés: le complexe antigène-anticorps est révélé par formation d'un composé coloré après l'action catalytique de la peroxydase sur le substrat ajouté.

4- Après arrêt de la réaction, la lecture s'effectue au spectrophotomètre.

L'absorbance mesurée pour un échantillon permet de conclure quant à la présence ou à l'absence d'anticorps anti –HCV

Annexe test de khi 2

Effectifs observés

Résultats sérologiques	CMIA	ELISA1	ELISA2	PCR	Total
positif	172	119	142	20	453
négatif	17	70	47	169	303
Total	189	189	189	189	

Effectifs calculés

Résultats sérologiques	CMIA	ELISA1	ELISA2	PCR
positif	30.47	0.29	7.29	76.78
négatif	45.56	0.43	10.91	114.79

X^2 calculé = 286.55 / ddl=3/ X^2 théorique = 7.81