

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE – SAAD DAHLEB – BLIDA
FACULTE DES SCIENCES AGRO-VETERINAIRES ET BIOLOGIQUES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire en vue de
L'obtention du diplôme de
MASTER
En Science de la nature et de la vie
Option : **Génétique et physiologie**



Thème

**Le suivi des hémodialysés traités atteints
d'hépatite C chronique par PCR en temps
réel**

Présenté par ; BENZERFA Rabéa.

Soutenu le : 20/12/2012

Devant le jury composé de:

Nom	Grade	lieu	Qualité
Mme TAKARLI S.	MAA	Université de Blida	Présidente.
Mme KHETTAR S.	MAA	Université de Blida	Examinatrice.
Mlle METIDJI H.	MAB	Université de Blida	Examinatrice.
Mme BENSLEM A.	MAA	Université d'Alger	Promotrice.
Mr BESSAAD M A.	MAA	Université de Blida	Co-promoteur.

Promotion : 2011-2012

Remerciement

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force, la volonté, et la patience durant toutes mes années d'étude.

Je voudrais remercier chaleureusement mon encadreur Dr Bensalem, Maître assistante, chef de service dans le laboratoire des hépatites virales à l'IPA, pour avoir accepté de diriger ce travail, vous m'avez laissé la liberté nécessaire à l'accomplissement de mes travaux durant cette thèse tout en y gardant avec patience un œil critique et avisé. Votre détermination et vos conseils, tout ceci n'aurait pas abouti.

Je tiens à remercier également mon co-promoteur Mr. BESSAAD M A professeur à l'université de Saad Dahlab Blida, qui m'a fait l'honneur de m'avoir conseillé et guider pendant l'accomplissement de ce travail. Merci pour votre patience, votre disponibilité et votre dynamisme.

Je tiens à remercier les membres du jury pour leur disponibilité et leur amabilité envers moi.

Je présente également mes gratitude à la merveilleuse équipe dont j'avais l'honneur de bénéficier de leur expérience ; Mahdia Fatima, Nardjess, et Mr chrif et fatima Zohra pour leur indispensable collaboration, pour le soutien et la patience qui l'ont manifesté envers moi.

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

A mon mari KARIM qui n'a laissé aucun effort pour venir à mon aide.

À ma sœur Aicha et mes frères Rachid et Djamel, et à toute ma famille(BENZERFA) et ma belle-famille (BOUALI), mes amis (Ikram, Halima...), mes collègues (Ouahiba, imenou, miu, nessou, karima, et tout le groupe de génétique) qui m'ont accompagnée tout au long de mes études. Je vous adresse tout mon amour et ma reconnaissance.

TABLE DES MATIERES

Remerciement	i
Table des matières	ii
Liste des abréviations	v
Liste des figures	vii
Liste des tableaux	ix
Introduction	1

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Le virus de l'hépatite	3
I.1.a historique.....	3
I.1.b Les propriétés du virus.....	3
I.1.c Les protéines virales.....	6
I.1.c.1 les protéines structurales	6
a. protéine de la capsid	6
b. protéines F ou ARFP	7
c. glycoprotéines d'enveloppes E1 et E2	7
d. Protéine P7	7
I.1.c.2 les protéines non structurales	7
a. protéine NS2.....	7
b. protéine NS3.....	7
c. protéine NS4A	7
d. protéine NS4B	8
e. protéine NS5A	8
f. protéine NS5B.....	8
I.1.d Cycle cellulaire du VHC et réplication	8

I.1.e Variabilité génétique du VHC.....	9
I.1.f Réaction immunitaire et mécanisme d'échappement du virus	9
I.2 l'hépatite C : la maladie	10
I.2.a Epidémiologie	10
I.2.b Mode de transmission	11
I.2.c Physiopathologie	11
I.3 traitement et thérapeutiques	12
I.4 Techniques de diagnostic du virus de l'hépatite C	13
I.5 L'hépatite C chez les hémodialysés chroniques	14
I.5.a Généralité	14
I.5.b les caractéristiques de la charge virale chez les patients hémodialysés chroniques VHC(+)......	15

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1 Échantillonnage	16
II.2 Matériel.....	16
II.2.a Etude sérologique	16
II.2.b Etude moléculaire	17
II.3 Méthodes	18
II.3.a Les prélèvements sanguins	17
II.3.b les tests sérologiques	17
II.3.b.1 Technique ELISA manuelle	17
II.3.b.2 Le test AxSYM® HCV version 3.0.....	19
II.3.c les tests moléculaires	19
II.3.c.1. PCR en temps réel avec le TaqMan :	20
II.3.c. PCR en temps Réel avec le système m2000	23

II.3.c.3 Génotypage	26
---------------------------	----

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III. Résultats	28
III.1. Répartition des patients selon le sexe	28
III.2. Répartition des patients selon l'âge	28
III.3. Répartition selon les génotypes	30
III.4. Répartition des patients selon le stade de traitement.....	31
a) Patients au stade pré-thérapeutique	32
b) Patients à 3 mois de traitement.....	33
c) Patients à 6mois de traitement.....	34
d) Patients à 12 mois de traitement.....	35
e) Patients à 6 mois après arrêt de traitement	36
III.5 Répartition des patients selon la réponse au traitement	38
III.6. Répartition des patients selon le type de réponse au traitement.....	38
Conclusion générale	43

Annexes

LISTE DES ABREVIATIONS

aa	: acide aminé
ADN	: Acide Désoxyribonucléique.
ADNc	: Acide Désoxyribonucléique complémentaire.
ADNss	: Acide désoxyribonucléique single strand
ARFP	: Alternate Reading Frame Protein
ARN	: Acide ribonucléique.
dNTP	: Deoxynucleoside triphosphates.
EIA	: Test immuno-enzymatique.
eIF2	: eukaryotic initiation factor 2
ELISA	: Enzyme-Linked immunosorbent Assay
E1et E2	: Protéines d'enveloppes E1 et E2.c
G-C	: Guanine-Cytosine
HD	: hémodialysés
IC	: Contrôle Interne
IFN PEG	: Interféron pégylé.
IgG	: Immunoglobuline de type G.
IPA	: Institut pasteur d'Alger.
IRES	: Site d'entrée interne du ribosome.
Kb	: Kilo base.
KDa	: Kilo-daltonien.
LIS	: Logistics Information System
MEIA	: Microparticulaire Enzymatique Immuno Assay.
NIH	: National Institutes of Health
m2000rt	: m2000 transcription inverse.
m2000sp	: m2000 préparation de l'échantillon.
NC	: Non codant.
NM	: Nanomètre.
NS	: Non-structural.
Nt	: Nucléotide
OMS	: Organisation mondiale de la santé.

ORF	: Cadre ouvert de lecture / Open reading frame.
PBH	: Ponction biopsie hépatique.
PCR	: Polymerase chaine reaction.
p7	: protéine7 Kda.
QS	: Contrôle interne.
RBV	: Ribavirine.
RE	: Réticulum endoplasmique.
REF	: Référence.
RT-PCR	: Reverse transcriptase PCR.
<i>rThpol</i>	: <i>Thermus thermophilus</i> Recombinante.
RVS	: Réponse virologique soutenue.
RVP	: Réponse virologique précoce.
SI	: Stem-loop (structure en tige et boucle)
SPP	: Signal-Peptide Peptidase
TCA	: ThermoCycleur segment A
TCB	: ThermoCycleur segment B
TMA	: Transcription-Mediated Amplification
TMB	: TétraMéthylBenzidine
UI	: Unités internationales.
UI/ml	: Unité internationale / millilitre.
VHC	: Virus de l'Hépatite C

LISTES DES FIGURES

N°	Titre	Page
01	Représentation de la structure du VHC.	03
02	Arbre phylogénétique schématique des genres et des principaux virus de la famille des <i>Flaviviridae</i> .	04
03	Organisation génomique du VHC.	04
04	Modèle de structure secondaire de la région 3' NC du VHC.	05
05	Modèle de structure secondaire de la région 3' NC du VHC.	06
06	Représentation schématique du cycle réplcatif du VHC.	08
07	Prévalence de l'infection par le VHC dans le monde.	10
08	Histoire naturelle de l'infection par le VHC.	12
09	Algorithme décisionnel et de suivi du traitement de l'hépatite chronique C par la combinaison d'interféron alpha pégylé et de ribavirine en fonction du génotype	13
10	Représentation schématique générale du principe d'ELISA.	17
11	Principe de la PCR quantitative en temps réel avec sonde TaqMan.	21
12	Le suivi de la cinétique d'une réaction de PCR en temps réel.	24
13	Représentation des conditions de thermocyclage.	26
14	Représentation des sondes d'ADN SS marqués par un fluorophore quencher et fluorophore rapporteur	27
15	répartition des patients selon le sexe chez des patients VHC(+) sans pathologie associée et des patients VHC(+) hémodialysés	28

16	répartition des patients VHC(+) sans pathologie associée (n=138) et des patients VHC(+) hémodialysés (n=91) selon les tranches d'âge.	29
17	répartition des patients VHC(+) sans pathologie associée (n=173) et des patients VHC(+) hémodialysés (n=97) selon les génotypes.	30
18	Charges virales quantifiées par PCR en temps réel au stade pré-thérapeutique.	33
19	Charges virales quantifiées par PCR en temps réel à 3 mois de traitement.	34
20	Charges virales quantifiées par PCR en temps réel à 6 mois de traitement.	35
21	Charges virales quantifiées par PCR en temps réel à 12 mois de traitement.	36
22	Charges virales quantifiées par PCR en temps réel à 6 mois après arrêt de traitement.	37
23	Répartition des patients selon la réponse virologique.	38
24	Répartition des patients selon les génotypes.	

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I.	Origines et caractéristiques des différents produits utilisés pour l'étude sérologique utilisés au niveau de l'IPA.	16
II.	la répartition des patients en fonction du stade du traitement.	31
III.	la répartition des patients en fonction des génotypes et du stade du traitement.	31
IV	Patients au stade pré-thérapeutique.	32
V	Effet du traitement de 3 mois (12semaines) sur la charge virale.	33
VI	Effet du traitement de 6mois (24 semaines) sur la charge virale.	34
VII	Effet du traitement de 12mois (48 semaines) sur la charge virale.	35
VIII	6mois (24 semaines) après arrêt de traitement et la charge virale.	36
IX	répartition des patients hémodialysés VHC(+) (n=20) et les patients VHC(+) sans pathologie associée (n=79) selon la réponse au traitement.	37

Introduction

Le virus de l'hépatite C (VHC) est à l'origine d'une pandémie ayant des conséquences dramatiques en matière de santé publique mondiale (Lauer *et al*, 2001). Il a été identifié en 1989 comme étant l'agent responsable de la majorité des hépatites non-A non-B post-transfusionnelles (Choo, 1989).

Aucun vaccin préventif n'existe actuellement contre ce virus. Le traitement actuel est fondé sur l'association de l'interféron α pégylé et la ribavirine (Cernescu *et al*, 2011). Cependant, de nombreux patients sont encore rechuteurs ou non répondeurs avec le traitement standard de l'hépatite chronique C.

Les patients hémodialysés (HD) constituent une population à haut risque d'infection par le VHC. La prévalence de l'infection à VHC est très variable chez les patients dialysés d'un centre à l'autre ou d'un pays à l'autre et elle est beaucoup plus importante par rapport à la population générale.

En hémodialyse, comme dans la population générale, l'infection par le VHC est souvent asymptomatique en phase aiguë et l'infection chronique conduit habituellement à des hépatopathies chroniques qui évoluent vers la cirrhose ou le carcinome hépatocellulaire

Les différentes techniques virologiques utilisées dans le laboratoire des hépatites virales de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA) notamment la nouvelle technique de la PCR en temps réel permet aujourd'hui une quantification plus sensible et plus précise du génome viral. Elle aide à l'estimation de la réponse virologique au traitement en mesurant la variation de la charge virale.

A partir de cet ensemble de données actuelles et vu l'important enjeu que ça représente à l'échelle de santé publique et celle économique nous avons jugé qu'il été urgent et indispensable de mener ce travail d'analyse à travers l'évaluation de la réponse au traitement, en s'intéressant aux patients infectés par le virus de l'hépatite C sans autre pathologie associée et des patients hémodialysés ayant une hépatite C. pour mener à bien des investigation de cet ordre notre choix s'est orienté vers le laboratoire des hépatites virales de référence au sein de l'IPA.

L'objectif de notre étude est de déterminer la charge virale du VHC et faire un suivi dans les deux populations différentes infectées par le VHC (sans pathologie associée ainsi que chez les hémodialysés).

Ceci nous permettra de mieux comprendre la réponse au traitement antiviral et de déduire les facteurs qui influencent cette réponse pour une meilleure maîtrise de la stratégie thérapeutique dans son établissement et dans son efficacité à court et à long terme.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

I.1. LE VIRUS DE L'HEPATITE C (VHC)

I.1.a. historique

Dans les années 1970, des études épidémiologiques décrivaient de nouveaux cas d'hépatites virales transmises lors de transfusions sanguines. Ces hépatites ont alors été nommées « non-A non-B » car de nouveaux tests diagnostiques avaient permis de montrer que les virus des hépatites A et B n'étaient pas responsables de ces nouveaux cas. C'est seulement en 1989 que l'équipe de Mickaël Houghton a identifié pour la première fois le virus responsable de cette nouvelle hépatite virale : le virus de l'hépatite C ou VHC (Choo *et al.* 1989). Le génome viral a ensuite été rapidement séquencé et la comparaison avec d'autres séquences virales connues a permis de classer le VHC dans un nouveau genre de la famille des *Flaviviridae*, le genre *Hepacivirus* (International Committee on Taxonomy of Viruses. *et al.* 2005).

I.1.b. propriétés du virus

➤ Structure

C'est un virus de 55 à 65 nm de diamètre (kaito *et al.* 1994) ; il est constitué principalement de trois structures :

- Le génome viral constitué d'une molécule d'ARN monocaténaire de polarité positive et logée dans une coque protéique icosaédrale,
- la capsidie protéique, formé par la polymérisation de la protéine de la capsidie.
- Enveloppe, entourant la nucléocapsidie, de nature lipidique provenant des membranes du réticulum endoplasmique des cellules infectées et sur laquelle sont ancrées deux glycoprotéines virales, E1 et E2 organisées en complexe hétérodimérique non covalent. (figure 1)

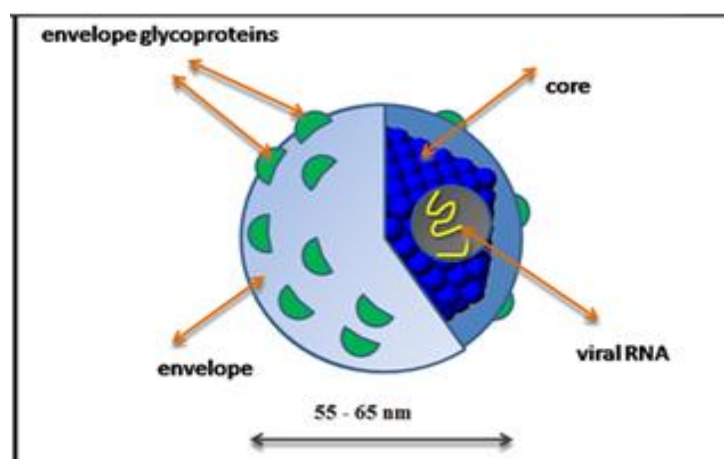


Figure 01: Représentation de la structure du VHC (Helle F *et al.*, 2008).

➤ Classification taxinomique

Le virus de l'Hépatite C est classé dans la famille des *Flaviviridae* (Choo *et al*, 1989; Takamizawa *et al*, 1991; Frank *et al*, 2000). Cette famille est subdivisée en trois genres : les *Flavivirus* souvent responsables d'arboviroses (virus de la fièvre jaune, virus de la dengue et virus de l'encéphalite à tique), les *Pestivirus* responsables de pathologies animales (virus de la peste porcine, virus de la diarrhée bovine) (Miller and Purcell, 1990) et les *Hepacivirus* (du grec hepar, hepato, foie) auquel appartient le VHC et le GB virus B (GBV-B) (Robertson *B et al*, 1998; Simmonds *et al*, 1994) (figure 2).

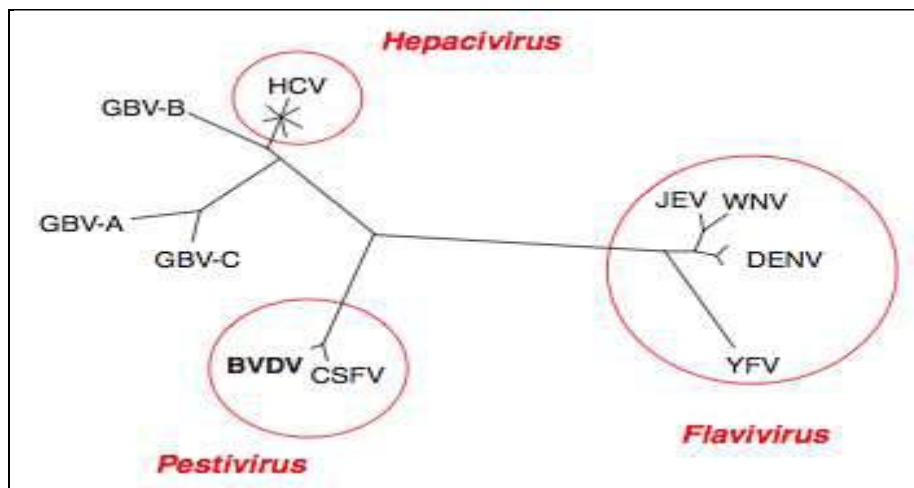


Figure 02 : Arbre phylogénétique schématisé des genres et des principaux virus de la famille des *Flaviviridae*. (Legrand-Abravanel, 2008).

➤ Organisation génomique

Le génome du virus de l'hépatite C est constitué d'un seul brin d'ARN positif de 9,6kb nucléotides (Choo *et al*. 1989). Riche en G-C, son organisation est identique à celle du génome des *Flavivirus* et des *Pestivirus*.

Il possède un seul cadre de lecture ouvert(ORF) flanqué par les régions non codantes 5' et 3' (figure3).

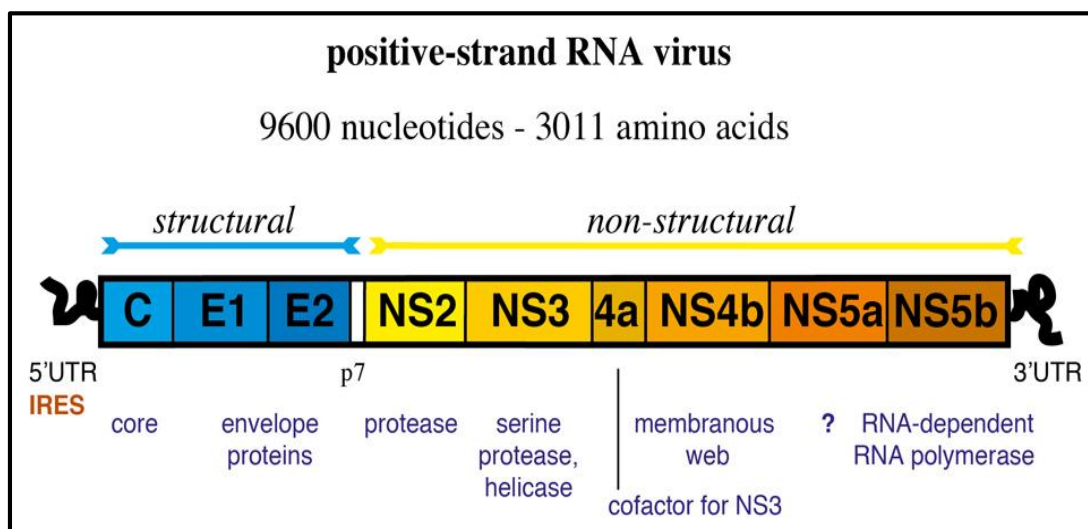


Figure 03: Organisation génomique du VHC (Markus and Heim, 2012).

- **La région 5' non codante**

L'extrémité 5' non codante (5'NC) d'une longueur de 341 à 349 nucléotides selon les isolats, renferme les régions les plus conservées du génome et est impliquée dans la synthèse des protéines virales. Son extrémité 5', ne comporte pas de coiffe méthylée, Elle présente des structures secondaires complexes en tige-boucle formant un site interne d'entrée du ribosome ou IRES (*Internal Ribosomal Entry Site*). L'IRES forme un complexe avec la petite sous-unité ribosomale 40S et des facteurs de traduction, essentiel à la production des protéines virales (Soussan, 2010). Elle est structurée en quatre domaines majeurs numérotés de I à IV auxquels s'ajoute un pseudo-nœud en amont du codon d'initiation de la traduction. L'IRES comprend les domaines II, III et IV du 5'NC et les 24 à 40 premiers nucléotides de la séquence codante de Core. (figure 04).

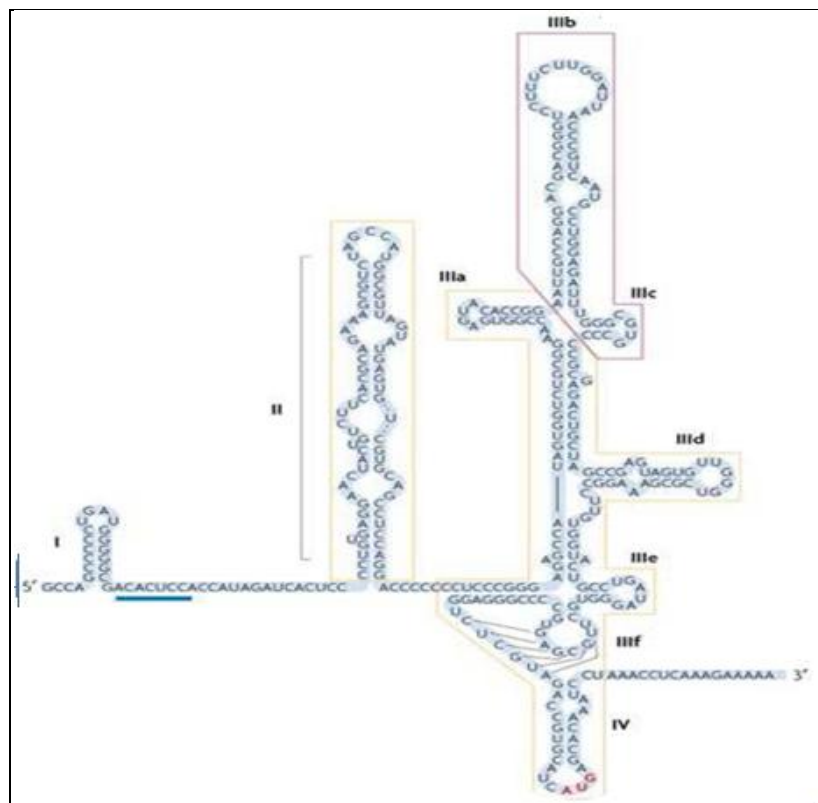


Figure 04 : Modèle de structure secondaire de la région 3' NC du VHC.

- **La région 3' non codante**

La région 3' non codante (3'NC) de taille variable selon les génotypes d'environ 200nt, joue un rôle important dans la réplication virale .elle contient trois domaines distincts : Une séquence interne poly uracile/pyrimidine (poly U/UC) de longueur variable, une région variable et une séquence de 98 nt très conservée nommée la région X replié en trois tiges-boucles (3'SLI, 3'SLII et 3'SLIII) joue un important dans l'initiation du brin d'ARN négative au cours de la réplication (kolykhalov et al. ,1996)

Il existe aussi en amont de la région 3' non codante, une structure tige boucle, (figure 05) appelé 5BSL3.2, qui interagit avec la boucle SLII de la région 3' non codante. Cette interaction est essentielle à la réplication de l'ARN virale (Friebe et al. 2005 ; You et al. 2004). (Figure 05)

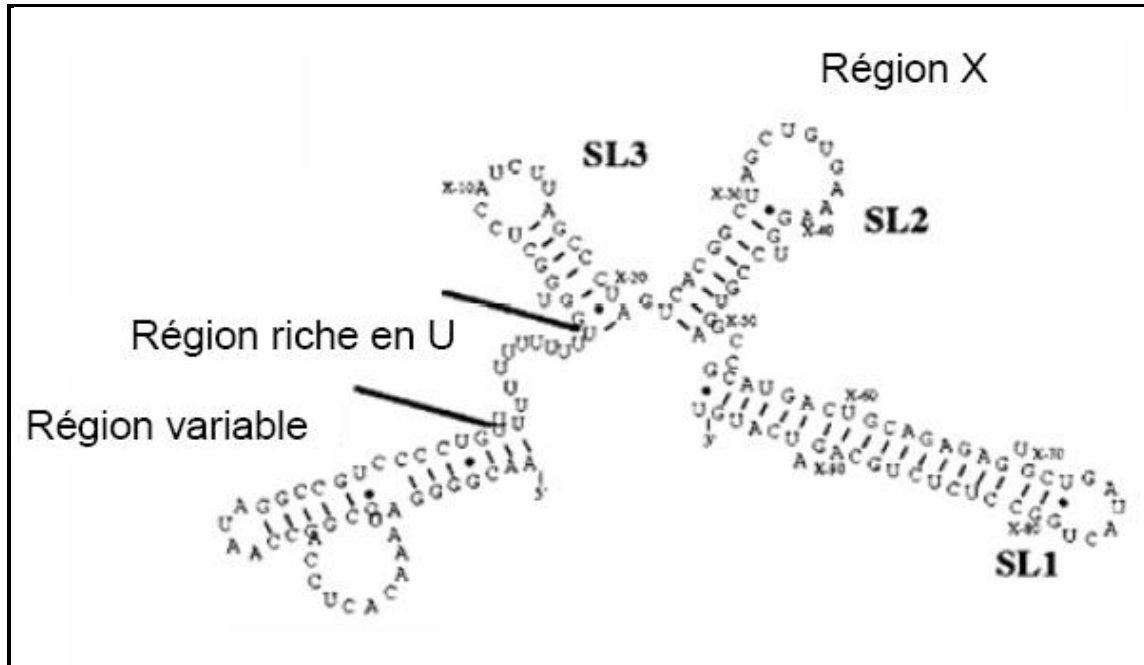


Figure 05 : Modèle de structure secondaire de la région 3' NC du VHC (Selon Ito et Lai 1997).

- **Le cadre de lecture ouvert**

La région 5' non codante est suivie d'un cadre de lecture ouvert unique débutant par un codon AUG initiateur de la traduction. Il comporte 9024 à 9111 nucléotides et code pour une polyprotéine d'environ 3000 acides aminés qui est secondairement clivée par les protéases cellulaires et virales pour générer sept protéines non structurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) et trois protéines structurales (une protéine de capsid C et deux glycoprotéines d'enveloppe, E1 et E2) (CHOO et al., 1991).

I.1.c. les protéines virales :

I.1.c.1. Les protéines structurales :

a. Protéine de capsid

La première protéine codée par le génome du VHC est la protéine de la capsid ou la protéine core (C), de 21kDa qui forme la nucléocapsid virale. Cette protéine se localise sur la membrane du réticulum endoplasmique (RE) (McLauchlan et al. 2002).

La protéine C joue un rôle essentiel dans l'assemblage et la libération des virus infectieux, mais elle intervient également au moment du désassemblage des particules virales, lors de l'entrée dans la cellule (Penin et al. 2004 ; Miyanari et al. 2007)

b. La protéine F ou ARFP

La protéine “F” (frameshift protein) ou “ARFp” (alternate reading frame protein) a été décrite, générée par un changement de cadre de lecture du ribosome dans la région amino-terminale de l’ORF codant la protéine Core. C’est une protéine de 17kda Sa fonction au cours du cycle viral reste indéterminée. Après la traduction, elle se localise dans le RE et sa demi-vie très courte est d’environ dix minutes, car elle est dégradée par le protéasome (Xu et al. 2003).

c. Les glycoprotéines d’enveloppe E1 et E2

Ce sont des protéines transmembranaires de type I synthétisées à partir d’une polyprotéine virale grâce à l’action du signal peptidase de l’hôte.

Ces protéines de structure rentrant dans la composition de l’enveloppe virale possédant une grande partie externe (ectodomaine) N-terminale et une partie transmembranaire C-terminale. Lors de la synthèse de ces protéines, les ectodomains de E1 et E2 sont dirigés vers la lumière du RE et leurs domaines transmembranaires sont insérés dans la membrane du RE.

Au cours de leur passage dans le RE, les protéines E1 et E2 s’assemblent sous forme d’hétérodimères E1E2 non-covalents. Ces hétérodimères non-covalents semblent constituer l’unité fonctionnelle des glycoprotéines du VHC (Op De Beeck *et al.* 2004).

d. La protéine p7

p7 est une petite protéine hydrophobe constituée de 63 aa ; intercalée entre les protéines structurales et non structurales (au cours de recherche) elle est localisée dans le RE par deux domaines transmembranaires, reliés par une boucle cytoplasmique, alors que ses extrémités N- et C-terminales sont orientées vers la lumière du RE (Carrere-Kremer *et al.* 2002).

I.1.c.2. Les protéines non structurales :

a. La protéine NS2

NS2 est une protéine multifonctionnelle transmembranaire de 21-23 kDa associée au RE par son domaine N-terminal hydrophobe. Elle n’est pas essentielle pour la formation du complexe de réplication mais impliquée dans la production de particules virales infectieuses (Jones et al.2007).

b. La protéine NS3

C’est une protéine multifonctionnelle possédant en son domaine C-terminal une activité sérine protéase et hélicase/NTPase (Tai et al.1996).

c. La protéine NS4A

NS4A est la plus petite protéine NS du VHC, elle fonctionne comme un cofacteur de la sérine protéase.

d. La protéine NS4B

C'est une protéine hydrophobe, de 27kDa, intégralement associée aux membranes du RE (Hugle et al.2001). Elle induit la formation d'un compartiment membranaire spécialisé, dérivé des membranes du RE, appelé « complexe de répliation » qui est le siège de la répliation virale (Egger et al.2002).

e. La protéine NS5A

NS5A est une phosphoprotéine, de 56-58kDa, associée à la membrane du RE comme beaucoup de protéines du VHC, (Brass et al. 2002). Impliquée dans les interactions protéine-protéine nécessaires à l'assemblage d'un complexe de répliation fonctionnel.

f. La protéine NS5B

C'est l'ARN polymérase ARN-dépendante du VHC (RpRd); elle a un rôle de catalyseur au sein de la machinerie de répliation de l'ARN. NS5B est une protéine associée à la membrane par son domaine transmembranaire C-terminal (Ivashkina et al., 2002) et qui est indispensable pour la répliation virale en culture cellulaire (Moradpour et al., 2004a).

I.1.d. Cycle cellulaire du VHC et répliation

L'identification du ou des récepteurs du VHC est essentielle à la compréhension de sa pathogénèse.

De surcroît les mécanismes de répliation du VHC sont encore imparfaitement connus, du fait de l'absence d'un système de culture virale hautement efficace ou d'un bon Modèle animal.

La compréhension actuelle des mécanismes moléculaires de la répliation du VHC repose sur des analogies avec les virus de la même famille, sur l'amélioration des modèles cellulaires et sur la caractérisation de protéines recombinantes du VHC (Paul et Dominique, 2003).

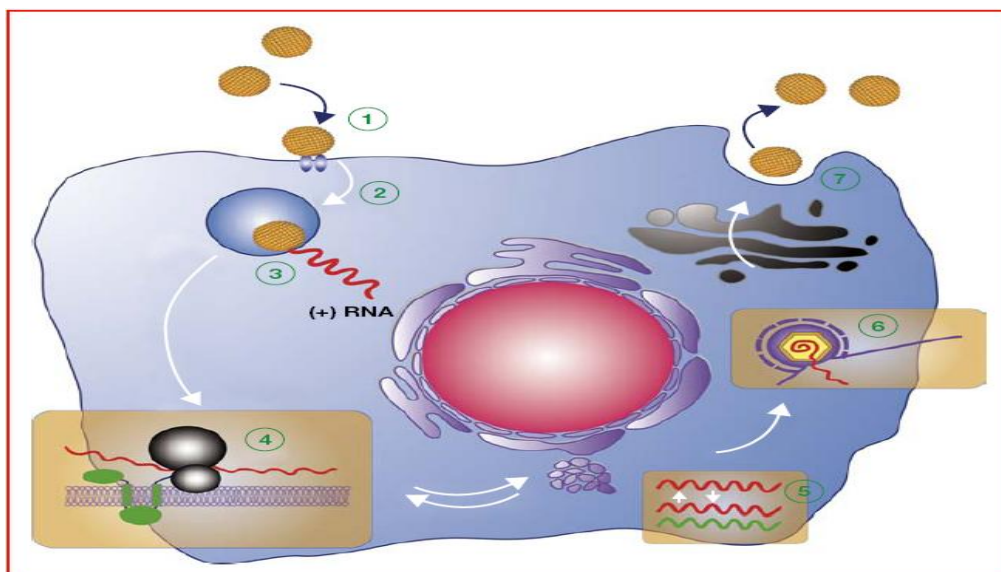


Figure 06: Représentation schématique du cycle répliatif du VHC (Lindenbach BD, et al. 2007)

1. Le virus se lie à la surface des cellules sur leur(s) récepteur(s) spécifique(s).
2. Le virus est alors endocyté par une voie dépendante de la clathrine. Le passage d'un virus de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule est appelé entrée virale.
3. L'enveloppe virale fusionne alors avec la membrane des endosomes précoces, permettant la libération de l'ARN viral dans le cytoplasme.
4. Le génome sert à la synthèse des protéines virales dans le réticulum endoplasmique (RE).
5. En parallèle, le génome du VHC sert à la synthèse de brins négatifs qui serviront de matrice pour la synthèse de nouvelles molécules d'ARN de polarité positive.
6. Les protéines structurales servent à l'assemblage de nouvelles particules qui suivront la voie de sécrétion jusqu'à leur export hors de la cellule (7).

I.1.e. Variabilité génétique du virus de l'hépatite C

Le VHC présente une grande variabilité génétique, caractérisée par six génotypes majeurs, classés selon le degré de similarité de leur séquence nucléotidique (numérotés de 1 à 6) et plusieurs dizaines de sous-types (1a, 1b ...). La séquence nucléotidique entre les génotypes diffère d'environ 30%, alors que la variation entre les sous-types est d'environ 20% (Simmonds P *et al.* 2005). Les différents génotypes sont répartis de manière inégale à travers le monde. Le génotype 1 est retrouvé sur l'ensemble des continents, le sous-type 1b est prédominant en Europe, alors que le sous-type 1a est majoritaire en Amérique du Nord. Par opposition, certains génotypes sont localisés dans des régions bien précises du globe, comme le génotype 4 en Egypte ou le génotype 5 en Afrique du Sud.

La grande variabilité de ce virus est due à l'absence d'un système de correction des erreurs de la polymérase virale lors de l'étape de répliation du brin d'ARN. Cette variabilité est en partie responsable de la persistance virale et donc de la chronicité de la maladie, et d'un échappement immunologique, thérapeutique et vaccinal du virus (Martell et al. 1992).

I.1.f. Réaction immunitaire et mécanismes d'échappement du virus

L'infection par le VHC est le fruit d'une interaction à long terme entre le virus et la réponse immune de l'hôte infecté elle-même sous la dépendance de ses caractéristique génétiques propres. la réponse immune joue un rôle majeur au cours de l'infection aigue : elle permet la guérison spontanée dans 20% des cas, mais ne protège alors pas d'une réinfection ultérieure, elle ne peut pas empêcher l'évolution chronique dans 80% des cas (PAWLOTSKY, 2001).

Les réponse humorales jouent un rôle centrale dans la neutralisation des particules virales intracellulaires (Shimizu YK, Igarashi H, et al, 1996). Les réponses cellulaires ont pour tache essentielle d'éliminer les virus intracellulaires. Ce faisant, elles détruisent les cellules infectées et réduisent l'expression des gènes viraux grâce à l'action de cytokines produites par de nombreux types cellulaires. Ces actions ont un effet bénéfique : elles permettent d'éliminer nombre de cellules infectées et de réduire la répliation du virus. Elle ont également des effets délétères, car elles sont de l'apparition et de l'évolution des lésions hépatiques, à l'origines de la maladie virale C (Berke G, 1995).

- **Les mécanismes d'échappement du virus**

Les mécanismes de la persistance virale sont donc ceux de l'échec des réponses immunes à contrôler la réplication du virus et sa propagation à l'intérieur du foie. La compréhension de ces mécanismes reste incomplète, en grande partie parce que les patients ayant une hépatite aigüe spontanément résolutive sont rares et ont été peu étudiés.

Pour échapper à la pression immunitaire de l'hôte, le VHC utilise un certain nombre de stratégies comme la régulation de gènes cellulaires et viraux, l'interférence de diverses voies de signalisation. Mais un des mécanismes les plus étudiés est sans doute l'échappement associé au polymorphisme viral.

I.2. L'hépatite c : la maladie

I.2.a. Epidémiologie

L'Organisation Mondiale de la Santé estime que 130 millions de la population mondiale a une infection chronique, soit une prévalence de 3% et que 3 à 4 millions de nouveaux cas déclarés chaque année et à plus de 350 000 le nombre de décès annuels dus à des maladies du foie liées à l'hépatite C (OMS, 2012).

Bien que le VHC soit endémique dans le monde entier, il existe une grande variabilité géographique de sa distribution (figure07)

En Algérie, Le nombre de personnes atteintes par le virus de l'hépatite C atteint 320.000 cas dont la prévalence est de (1- 2%), selon le ministère de la santé en 2007.

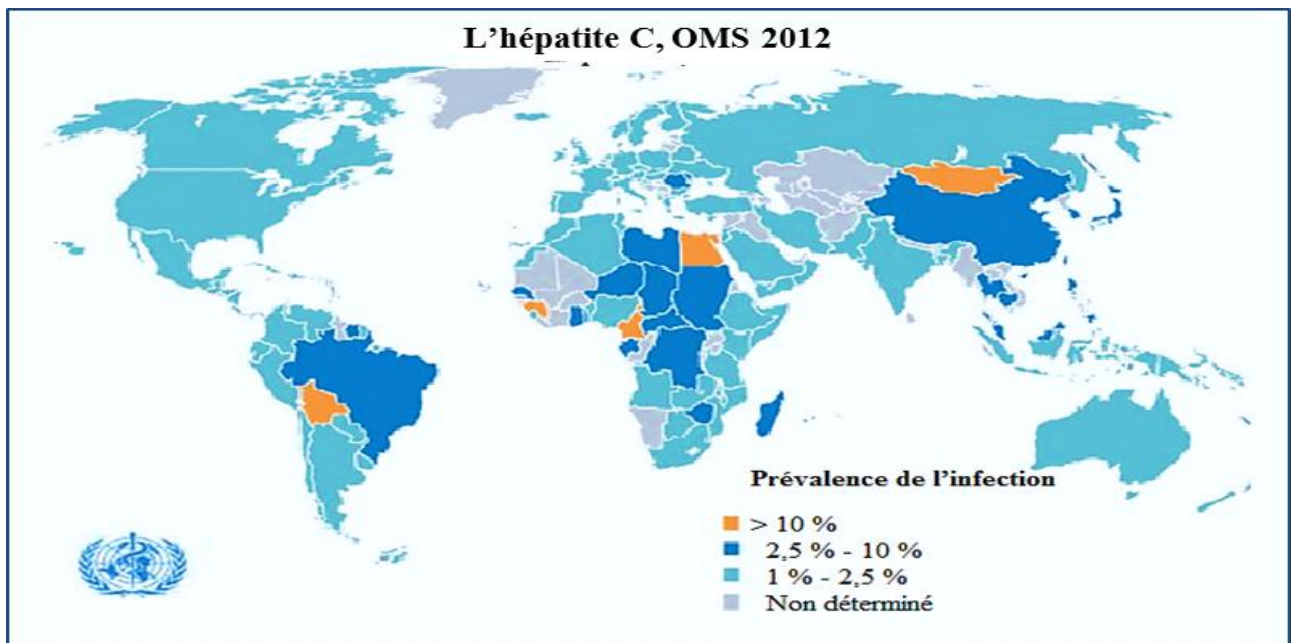


Figure 07: Prévalence de l'infection par le VHC dans le monde (OMS, 2012).

I.2.b. Modes de transmission

La transmission du VHC se fait par voie parentérale. Le mode majeur de transmission est le contact direct avec le sang. Ce mode de transmission comprend les transfusions sanguines non contrôlées, les transplantations d'organes, l'usage de drogue intraveineuse avec partage de seringues, les transmissions nosocomiales (matériel médical) et certaines pratiques sociales et culturelles (tatouage, piercing, circoncision). Le risque de transmission par voie sexuelle est très faible, elle est toute fois possible, en particulier à l'occasion de rapports pendant les règles, en cas d'infections génitales ou de lésions des organes sexuels.

Une co-infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) favoriserait la transmission du VHC. D'autres maladies sexuellement transmissibles joueraient aussi un rôle de cofacteurs pour la transmission du VHC. Un autre facteur qui augmente le risque de transmission du VHC est la charge virale. Les personnes qui présentent des anticorps anti- VHC, mais chez lesquelles aucun ARN viral n'est détectable, ne semblent pas transmettre le VHC. Une charge virale élevée chez des partenaires sexuels ou des femmes enceintes augmente les chances de transmission de virus (Thomas, 2000).

I.2.c. Physiopathologie

L'hépatite C est une maladie progressive, la phase aiguë évolue vers la chronicité, qui à long terme peut conduire à la cirrhose et à l'hépatocarcinome (figure 07)

L'hépatite C aiguë : Lors d'une infection aiguë par le VHC, qui est le plus souvent asymptomatique, seuls 20 à 30% des patients présentent des signes cliniques, le plus souvent peu spécifiques (fatigue, nausées, ictère, vomissement, anorexie). La période d'incubation est courte de 4 à 12 semaines. En moyenne, environ 25% des patients éliminent le virus spontanément.

L'hépatite C chronique est définie par la présence d'ARN VHC détectable dans le sang pendant plus de 6 mois. Cette infection reste asymptomatique dans la plupart des cas, mais peut s'accompagner d'une asthénie et dans certains cas de manifestations extra-hépatiques telles qu'une cryoglobulinémie, une néphropathie et une pathologie thyroïdienne (Zignego et al. 2007). Environ 25% des patients infectés chroniquement vont développer une cirrhose (Hoofnagle et al. 1997).

Carcinome hépatocellulaire chez 1 à 4% des patients, la pathologie évolue jusqu'au carcinome hépatocellulaire (Lauer et al. 2001).

Le taux de décompensation chez les patients qui présentent une cirrhose est estimé à 4%.

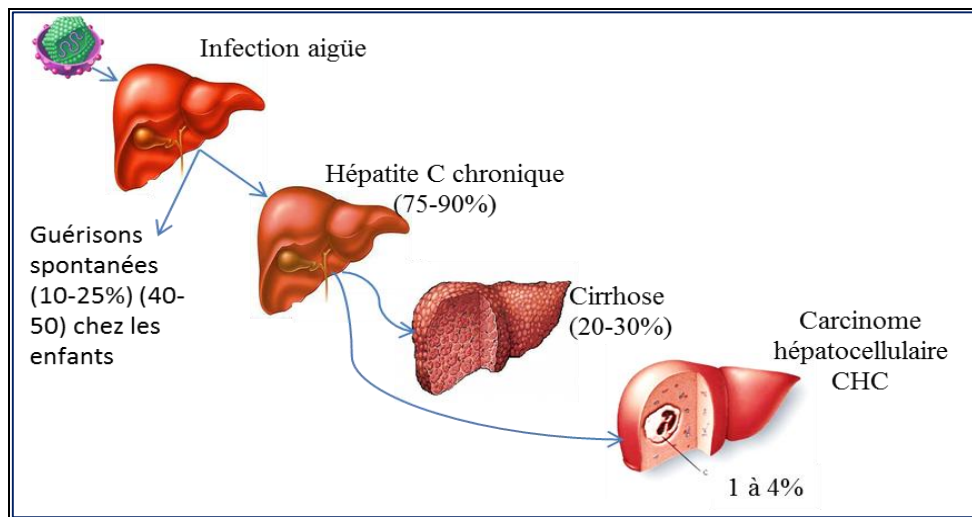


Figure 08: Histoire naturelle de l'infection par le VHC (Fofana, 2010)

I.3. Traitements et thérapeutiques

Le traitement de l'hépatite C s'adresse aux patients adultes qui présentent une infection chronique par le VHC. Les indications de prise de traitement reposent sur la ponction-biopsie du foie, et d'autres facteurs : qualité de vie, l'âge, et d'autres affections associées touchant ou pas le foie (le génotype viral également). La réponse virologique au traitement se caractérise par la disparition de l'ARN du HCV (Durocher et al. 2003).

En l'absence d'un vaccin efficace contre le VHC, la thérapie actuelle pour traiter l'infection chronique est l'interféron α pegylé en combinaison avec la ribavirine (Hugle and Cerny, 2003). En cas d'infection avec les génotypes 2 et 3 le traitement (interféron pegylé et ribavirine) est de 24 semaines, alors qu'il est de 48 semaines pour les infections avec les génotypes 1, 4, 5, 6.

Les interférons sont des glycoprotéines naturelles qui possèdent des propriétés antivirales et immunomodulatrices (Tan et al. 2002). Elles sont produites par l'organisme humain en présence d'une infection virale. Elles inhibent la réplication virale par phosphorylation du facteur d'initiation de la synthèse protéique eIF2 après son activation par phosphorylation de molécules intervenant dans la transduction du signal telles que STAT1 et STAT2.

De plus, l'IFN stimule le système immunitaire qui promeut l'élimination du virus infectant.

La rébavirine a un large spectre d'action contre les virus à ARN et ADN, et en particulier contre les virus de la famille de *Flaviviridae* (Reichard *et al.* 1991). La combinaison de ces deux molécules, établie en 2002 par le NIH Consensus Development Conference on Management of Hepatitis C, permet de traiter environ 80% des patients infectés par un VHC de génotype 2 ou 3 et la moitié de ceux infectés par un virus de génotype 1 (Fried *et al.* 2002). De telles données ne sont pas encore disponibles pour les génotypes 4, 5 et 6. L'efficacité limitée de ce traitement et ses lourds effets secondaires (fièvre, nausée, dépression...) rendent toutefois urgente la découverte de molécules plus spécifiques.

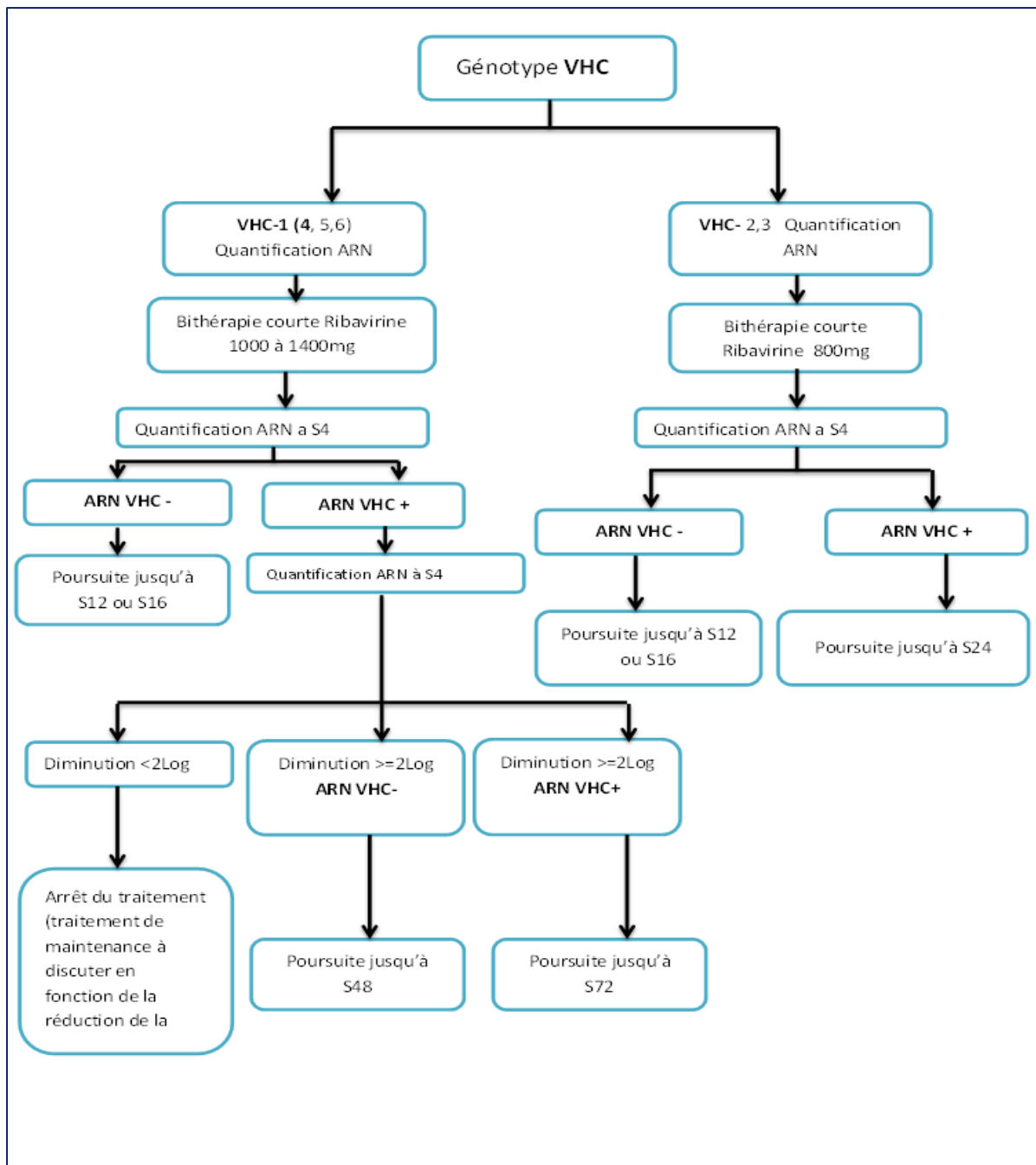


Figure 09: Algorithme décisionnel et de suivi du traitement de l'hépatite chronique C par la combinaison d'interféron alpha pégylé et de ribavirine en fonction du génotype (Chevaliez, 2008).

I.4. Techniques de diagnostic du VHC

Les tests diagnostiques de l'infection au VHC permettent de sécuriser les dons de sang et de plasma, et d'améliorer la prise en charge précoce des patients. Ces tests appartiennent à deux grandes catégories : les tests sérologiques (indirectes) qui détectent les anticorps anti-VHC et les tests moléculaires (directes) qui détectent et quantifient l'ARN viral et/ou déterminent le génotype du virus infectant le patient.

Les tests sérologiques : il s'agit des tests **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, en moyenne de 98% (Colin C, Lanoir D et al. 2001). présente beaucoup d'avantages or la grande spécificité : facilité d'utilisation et d'automatisation, coût relativement faible (Colin C *et al.* 2001).

L'ELISA de 3^e génération détecte la présence d'anticorps dirigés contre les protéines core, NS3, NS4 et NS5.

Les tests moléculaires : ils peuvent être classés en trois catégories : les méthodes de détection de l'ARN du VHC, les méthodes de quantification de l'ARN (charge virale) et les méthodes de génotypage.

Les tests qualitatifs de détection sont basés sur l'amplification d'une région cible en utilisant une PCR classique, la «real-time» PCR (PCR en temps réel) ou l'amplification médiée par la transcription (TMA) (Pawlotsky, 2002). L'ARN du VHC est extrait et rétrotranscrit en ADNc, qui est ensuite traité par un cycle de réactions aboutissant à la génération d'un grand nombre de copies, ce qui permet sa détection.

La quantification de l'ARN du VHC est intéressante dans le suivi thérapeutique de l'infection virale. Elle repose sur la détection et la quantification de l'ARN viral (RT-PCR, ADN braché, PCR temps réel) (Higuchi et al. 1993).

La détermination du génotype peut être réalisée par des techniques de biologie moléculaire, toutes fondées sur une PCR initiale (techniques dites de " génotypage "). En pratique clinique, le génotype peut être déterminé par séquençage direct après PCR de la région 5'non codante du génome viral, suivi d'une comparaison à une banque de séquences, ou par hybridation inverse des produits de PCR de la région 5'non codante à des bandelettes de nitrocellulose portant des sondes oligonucléotidiques spécifiques des principaux types et sous-types (Halfon et al., 2001).

I.5. L' HEPATITE C CHEZ LES HEMODIALYSES CHRONIQUES

I.5.a. Généralité

La prévalence de l'infection par HCV chez les patients hémodialysés (HD) est très variable d'un pays à l'autre (4-71%) (Wreghitt 1999; Rahnavardi, 2008). Ces dernières années, la prévalence a diminué grâce aux mesures de prévention mises en œuvres (utilisation de gants, matériel à usage unique, mesures d'isolement en hémodialyse) (Laporte, 2009).

Plusieurs facteurs de risques ont été identifiés, parmi lesquels, la durée (Simon N,et al.1994,Morales JM et al.2000) et le mode de dialyse. Les autres facteurs de risque sont le nombre de culots globulaires reçus, les antécédents de transplantation rénale, la présence d'une toxicomanie (Pereira BJ, Levey AS 1997). Et la présence d'une infection par le VHB (Morales JM, Campistol JM 2000).

L'hémodialyse est une technique d'épuration extra-rénale du sang, le mettant en contact avec un liquide de dialyse (le dialysat) a travers d'une membrane semi-perméable synthétique, par l'utilisation de deux phénomènes physiques, la diffusion et l'ultrafiltration.

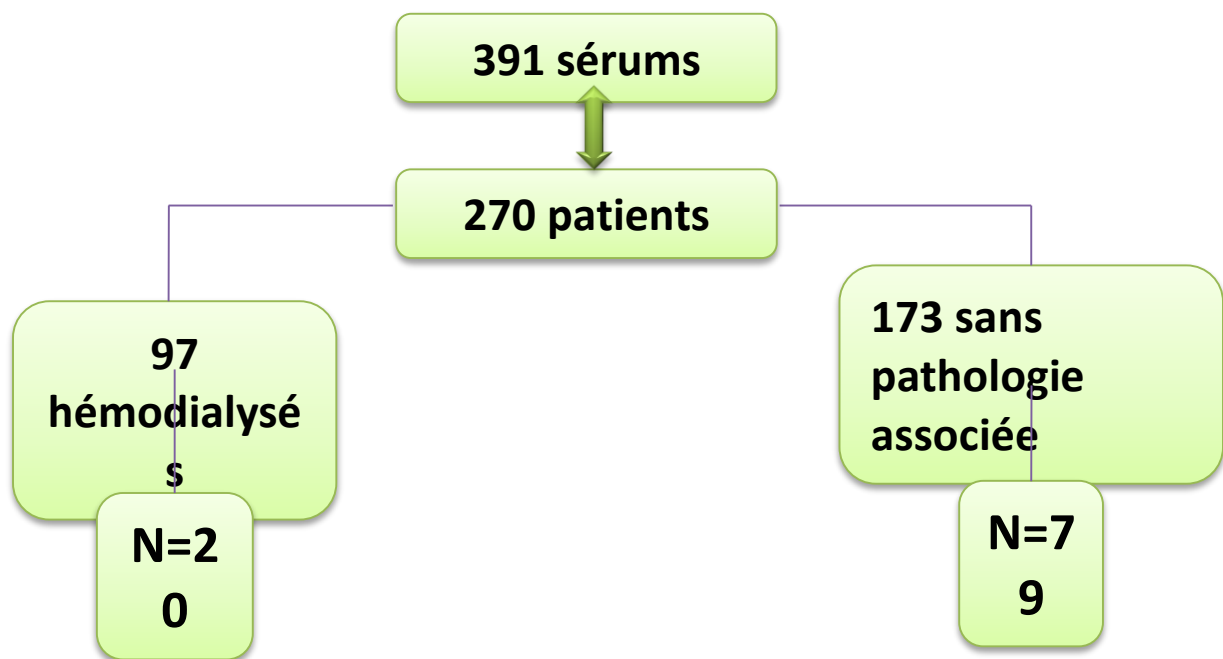
Chapitre II

Matériel et méthodes

La période de l'étude s'est étalée du mai à octobre 2012 au niveau du laboratoire des Hépatites Virales de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA) Annexe de Sidi-Fredj. C'est une étude rétrospective, le recrutement des patients s'est étalé de juillet 2012 à janvier 2010.

II.1. Échantillonnage

391 sérums ont été sélectionnés durant les deux années et demie, provenant de 270 patients séropositifs parmi eux 173 patients atteints d'hépatite C sans pathologie associée, et 97 patients atteints d'hépatite C et étaient hémodialysés.



N=patients qui ont eu un suivi régulier.

Les données ont été recueillies à partir des registres de transcription des résultats d'analyses virologiques des hépatites de l'IPA.

II.2. Matériel biologique et matériel technique :

II.2.a. Etude sérologique

- **Réactifs :**

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

Produits et fabricants	Présentation du produit	Principe du dosage	Nature de la phase solide	Nature de la phase liquide (conjugué)	Principe de la lecture des résultats
AxSYM[®] HCV version 3.0 (Abbott division diagnostic)	Plateforme automatisée	Immuno-enzymatique microparticulaire (MEIA)	Antigènes recombinants : HCr43, c200, 100-3 et NS5	Anticorps de chèvre anti-IgG humaines marqués à la peroxydase	Mesure de la fluorescence par le système optique MEIA
Monolisa[™] HCV Ag-Ab ULTRA (BIO-RAD)	Coffret	Immuno-enzymatique (EIA)	Antigènes recombinants : C, NS3, NS4, NS5	Anticorps de souris anti-IgG humaines marqués à la peroxydase	Mesure de la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450/620-630 nm
HCV AB (DIA. PRO)	Coffret	Immuno-enzymatique (EIA)	Antigènes recombinants : C, NS3, NS4, NS5	Anticorps anti-IgG et IgM humaines marqués à la peroxydase	Mesure de la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450/620-700 nm

- **Appareillage**
 - ✓ Voir la partie annexe

II.2.b. Etude moléculaire

- **Réactifs**
 - ✓ Abbott RealTime HCV Amplification Reagent Kit.
 - ✓ COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] TaqMan Analyser Kit.
- **Appareillage**
 - ✓ [®] AmpliPrep /COBAS[®] TaqMan[®] HCV analyser.
 - ✓ Abbott RealTime[™] HCV.
- **Matériel complémentaire**
 - ✓ Voir la partie annexe

Les constituants de l'ensemble des kits de réactifs utilisés pour la réalisation des différents tests sérologiques et moléculaires ainsi que l'appareillage et le matériel complémentaire se trouvent détaillé dans la partie Annexe.

II.3. Méthodes

II.3.a. Les prélèvements sanguins

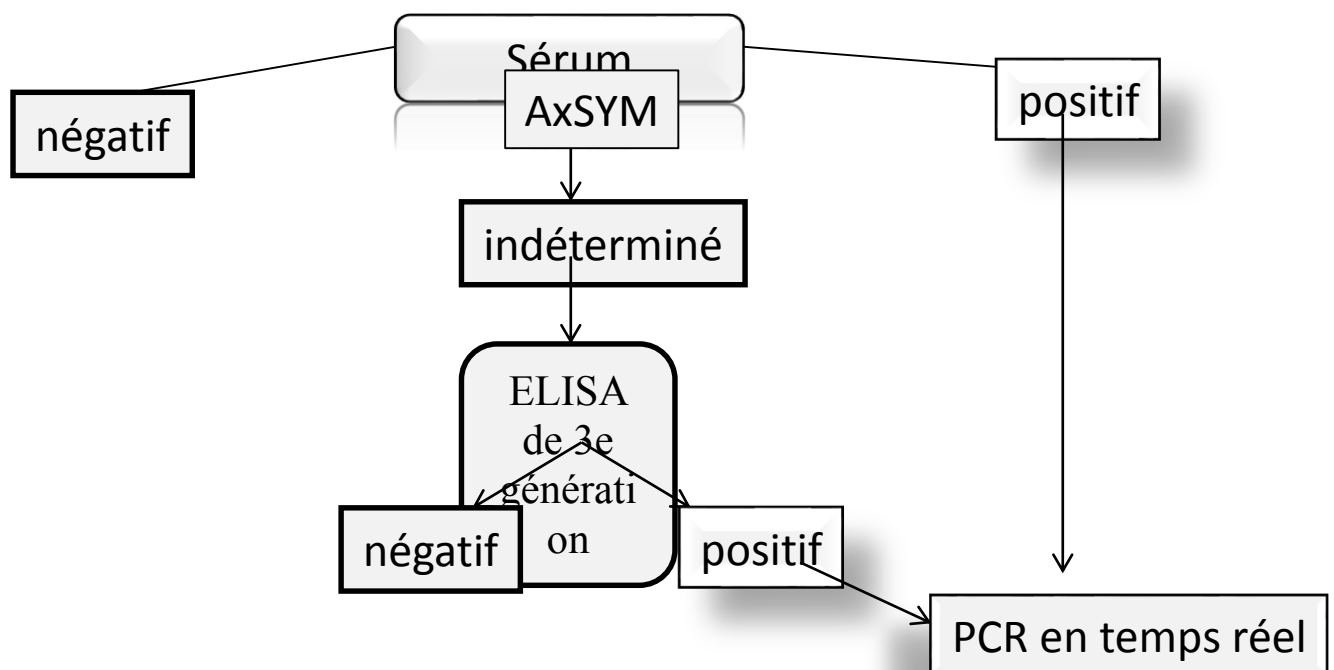
Le prélèvement sanguin est effectué dans un tube sec soit au sein de l'infirmerie de l'Institut Pasteur, soit auprès des différentes structures hospitalières du territoire national, selon une fiche technique du laboratoire des hépatites virales qui est diffusée au niveau de tous les secteurs.

Dans les 6 heures qui suivent le prélèvement, ce dernier doit être centrifugé à 1600g pendant 20minutes à température ambiante.

Après étiquetage, les sérums peuvent être conservés à 4°C pendant 72 heures maximum le temps d'être analysés ou bien congelés à une température de -20°C.

II.3.b. les tests sérologiques :

Deux techniques immuno-enzymatiques sont utilisées pour confirmer la présence du VHC dans les prélèvements :



Remarque : Pour réaliser cette étude, on doit passer les sérums dans des portoirs, les décongélés puis les ramenés à la température du laboratoire qui est de 24-25°C.

II.3.b.1. Technique ELISA manuelle :

C'est une technique immuno-enzymatique indirecte «Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-assay » de troisième génération de type sandwich pour la détection des anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C, dans le plasma ou le sérum humain.

La réaction repose sur l'utilisation d'une phase solide préparée avec des antigènes purifiés du VHC (provenant des régions core C, NS3, NS4, et NS5) et d'une phase liquide (conjuguée) constituée d'anticorps monoclonaux anti-IgG humaines couplés à la peroxydase.

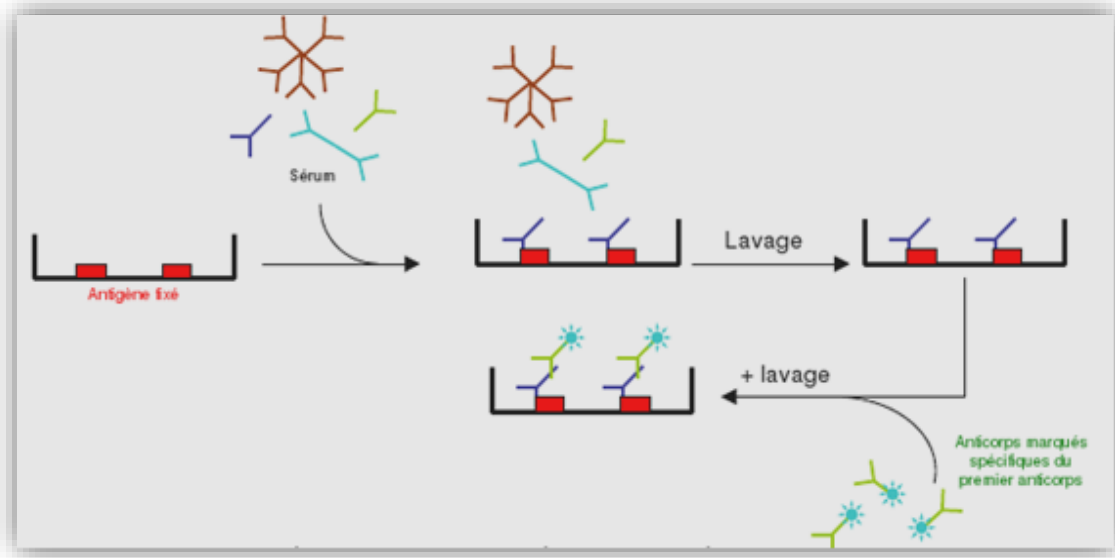


Figure 10 : Représentation schématique générale du principe d'ELISA.

Mode opératoire de la technique :

1. Distribution des sérums de contrôle ainsi que les échantillons sériques à analyser dans les cupules de la microplaque (phase solide). Des anticorps anti-VHC sont présents, ils se lient aux antigènes de la phase solide.
 - ✓ Un lavage est ensuite réalisé pour éliminer les anticorps non fixés.
2. Ajouter des anticorps anti-IgG humaines marqués à la peroxydase (conjugué) qu'ils se fixent à leur tour aux anticorps à doser retenus sur la phase solide.
 - ✓ Un deuxième lavage pour éliminer le conjugué enzymatique non lié.
3. Ajouter le substrat qui assure l'action catalytique de la peroxydase : révélation des anticorps fixés

- 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 l'absence d'anticorps anti-VHC.

II.3.b.2. Le test AxSYM[®] HCV version 3.0

AxSYM[®] HCV version 3.0 est un dosage immuno-enzymatique-microparticulaire (MEIA) pour détecter les anticorps dirigés contre les protéines structurales et non structurales du génome du VHC dans le sérum de chaque patient, on comparant le taux de formation du produit fluorescent à une valeur seuil calculée à partir d'une précédente calibration indice AxSYM[®] HCV version 3.0. Le résultat s'exprime en ratio, la valeur de l'échantillon (S) sur la valeur (CO), (S/CO) pour chaque échantillon et contrôle.

II.3.c. les tests moléculaires :

La détection de l'ARN du VHC par PCR en temps réel a été effectuée uniquement pour les sérums positifs pour les anticorps anti-VHC.

Ce test est utilisé pour évaluer la probabilité d'une réponse virale au début d'une thérapie antivirale et pour estimer la réponse virale au traitement antiviral par la mesure du changement des taux d'ARN du VHC dans le sérum des patients.

Au niveau du laboratoire des hépatites virales, et selon la disponibilité des réactifs, deux tests ont été utilisés :

II.3.c.1. PCR en temps réel avec le TaqMan :

Le dispositif expérimental disponible au laboratoire de virologie de l'IPA est constitué d'un préparateur automatique des échantillons et d'un analyseur composé d'un thermocycleur à deux segments (TCA+TCB) associé à un système d'enregistrement de la fluorescence.

Le préparateur et l'analyseur sont interfacés sur un ordinateur PC. À l'aide du logiciel AMPLILINK on peut programmer et contrôler les expériences de PCR, ainsi stocker et exploiter les données.

La PCR en temps réel nécessite deux amorces comme pour la PCR classique (sens et anti-sens) pour l'amplification du matériel génétique. Cependant, pour cette technique, un oligonucléotide (ou sonde TaqMan[™]) est ajouté en même temps que les amorces. Cet oligonucléotide est complémentaire d'une séquence interne du fragment d'ARN à amplifier située entre les deux amorces. A son extrémité 5' se trouve un fluorochrome rapporteur (reporter) et à son extrémité 3' se trouve un groupement quencher. Lorsque le fluorochrome et le quencher sont proches, la fluorescence est absorbée (éteinte) par le quencher par suite des effets de transfert d'énergie de type Förster.

Durant l'étape d'élongation de la PCR, il y aura séparation du fluorochrome de la sonde suite à l'activité de la nucléase 5'-3' de l'ADN-polymérase thermostable. Il y aura alors émission de la fluorescence car le fluorochrome rapporteur s'éloignera du groupement quencher

L'intensité de la fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'ARN amplifié au cours de la réaction de PCR. On peut suivre ainsi l'amplification de la séquence cible après chaque cycle, d'où le terme de "PCR en temps réel". Donc le TaqMan permet "vraiment" de suivre l'amplification à chaque cycle, mais il faut attendre que la réaction de PCR soit totalement réalisée pour la lecture des résultats transmis par le logiciel AMPLILINK.

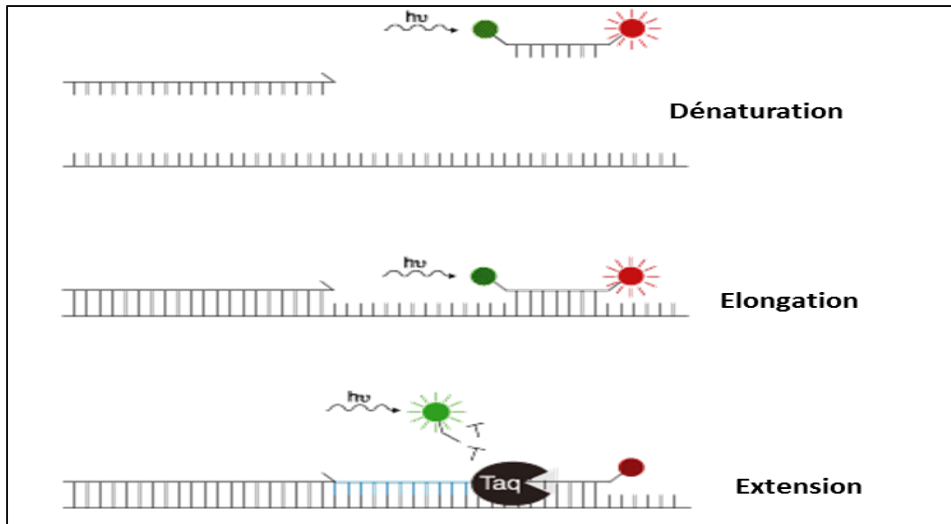


Figure 11 : Principe de la PCR quantitative en temps réel avec sonde TaqMan.

La réalisation de la PCR en temps réel avec le TaqMan test se fait selon les étapes suivantes.

a) Préparation de l'échantillon : extraction des ARN totaux.

L'instrument COBAS® AmpliPrep automatise l'ensemble du processus d'extraction de l'échantillon et de préparation de la plaque PCR. Ce test utilise la technique de capture générique basée sur la silice (chargée positivement). La procédure d'extraction traite 850 µl de sérum. Elle se déroule comme suit :

- Lyse des particules du VHC par incubation à l'aide d'une protéase et d'un tampon chaotrope de lyse qui libère des acides nucléiques et protège l'ARN libéré du VHC contre les ARNases du sérum.
- Ajout d'une quantité connue d'ARN du contrôle interne (QS) du VHC dans chaque échantillon.
- Liaison des ARN du VHC (chargés négativement) et des ARN du QS à la surface des particules magnétiques en verre.

- Une fois que les étapes de lavages terminées les ARN d'intérêt sont élués dans une solution aqueuse à température élevée (80°C).

Les ARN extraits sont ajoutés au mélange d'amplification constitué de dNTP, amorces, sondes et de polymérase recombinante thermostable. Par la suite, un volume réactionnel de 100 µl est pipeté dans chaque tube d'amplification (K tubes) puis sont déposés sur un support appelé le K carrier. Ce dernier est transféré manuellement à l'analyseur COBAS® TaqMan®48. Après cette étape, plus aucune intervention humaine n'est nécessaire : le COBAS® TaqMan®48 réalise l'étape d'amplification jusqu'aux résultats. Comme son nom l'indique, il possède une capacité de 48 puits (2x24).

b) Transcription inverse et amplification par PCR

Pour appliquer la PCR à l'étude de l'ARN, une étape supplémentaire, précédant l'étape d'amplification, est nécessaire : il s'agit de convertir les brins d'ARN en ADN complémentaires (ADNc).

Cette étape fait appel à une transcriptase inverse ou RT (Reverse Transcriptase) au moyen de l'ADN polymérase recombinante thermostable de *Thermus species* (Z05) qui grâce à ses activités multiples de transcriptase inverse, polymérase et nucléase 5'- 3' permet à la transcription inverse et à la polymérisation de se produire en même temps que la détection en temps réel des produits d'amplification (amplicons).

Les étapes de transcription inverse et d'amplification se déroulent comme suit :

- Dénaturation de l'hybride ARN- ADNc par chauffage à 95°C.
- Hybridation des amorces et de la sonde TaqMan™, à 60 C.
- Polymérisation, à 72°C, de L'ADN en commençant de l'extrémité 3'OH des amorces hybridées sur les matrices.

Ces trois étapes sont répétées 30 cycles.

❖ 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 (Figure 19).

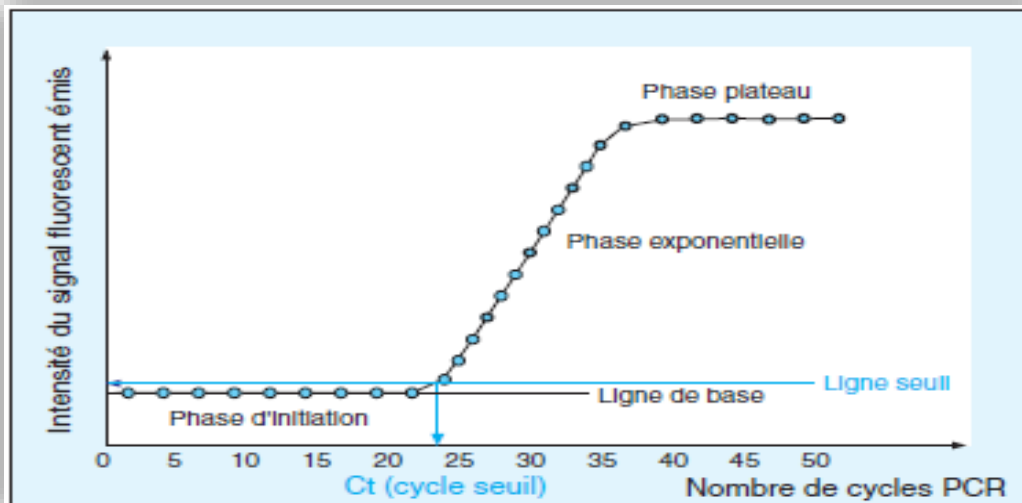


Figure 12 : Le suivi de la cinétique d'une réaction de PCR en temps réel.

- **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, le système ne permet plus une amplification exponentielle.

II.3.c. PCR en temps Réel avec le système m2000

C'est un test utilisant la technologie de PCR en temps Réel sur le système m2000 pour la détermination quantitative du Virus de l'Hépatite C dans le sérum ou le plasma d'individus infectés par le VHC (plage de linéarité de 12 UI/ml soit 1,08 log UI/ml à 100 millions UI/ml soit 8,0 log UI/ml).

Le test Abbott RealTime HCV sur m2000 est conçu de façon à quantifier d'une manière égale tous les génotypes HCV (1-6).

L'extraction de l'ARN est réalisée en méthode automatique (extracteur Abbott m2000sp,m24sp) ou Manuelle.

Le système m2000 comporte deux volets : le m2000sp d'Abbott et le m2000rt. Le logiciel sophistiqué et convivial du système fait le lien entre le m2000sp, un automate chargé de faire l'extraction, la purification et la préparation de l'ARN à partir de l'échantillon obtenu du patient et entre le m2000rt, qui est doté d'une interface LIS, il permet la visualisation des courbes et une traçabilité totale des analyses , c'est un outil de détection en PCR en temps réel qui

amplifie, détecte et mesure des niveaux infimes d'agents infectieux y compris le virus de l'hépatite C (HCV). Le système permet d'automatiser diverses étapes manuelles telle que le pipetage, ce qui contribue à réduire jusqu'à 75 % le temps des opérations de préparation de l'échantillon pour le test d'ARN.

Le dosage AbbotRealTime HCV utilise la RT-PCR afin de générer un produit amplifié du génome ARN du VHC dans des échantillons cliniques. Une séquence d'ARN non liée à la séquence cible de VHC est introduite dans chaque échantillon au début de la préparation des échantillons. Cette séquence d'ARN non liée est simultanément amplifiée par RT-PCR et sert de contrôle interne (IC).

Afin de s'assurer que le procédé a été correctement effectué pour chaque échantillon. La quantité de séquences cibles de VHC présente à chaque cycle d'amplification est mesurés à l'aide de sondes oligonucléotidiques marquées par fluorescence sur l'appareil m2000rt

Les sondes ne génèrent aucun signal, à moins d'être spécifiquement liées au produit amplifié. Le cycle d'amplification au cours duquel le signal fluorescent est détecté par le m2000rt est proportionnel au logarithme de la concentration d'ARN VHC présente dans l'échantillon d'origine.

La réalisation de la PCR en temps réel avec le système 2000 se faire selon les étapes suivantes :

❖ Préparation des échantillons

La préparation des échantillons a pour objectifs d'extraire et d'isoler les molécules d'ARN cible, de rendre les cibles accessibles pour l'amplification, et d'éliminer tout inhibiteur potentiel de l'amplification de l'extrait.

L'appareil m2000sp automatise l'ensemble du processus d'extraction de l'échantillon et de préparation de la plaque de réaction optique a 96 puits Abbott.

Le système de préparation des échantillons Abbott mTMSample préparation Système (4*24 préparations) utilise la technologie des particules magnétiques afin de capturer les acides nucléiques. Elle se déroule comme suit :

- Lyse des particules du VHC par incubation à l'aide d'un tampon de lyse (mlysis) qui libère des acides nucléiques et protège l'ARN libéré du VHC contre les RNases du sérum.
- Ajout (500ul) du contrôle interne (QS) du VHC dans chaque échantillon (le témoin).
- Liaison des ARN du VHC (chargés négativement) et des ARN du QS à la surface des particules magnétiques.
- Une fois que les étapes de lavages terminées les ARN d'intérêt sont élués dans une solution aqueuse à des températures élevées. Les ARN liés et élués sont transférés vers les tubes de sortie ou vers une plaque à 96 puits profonds.

Les ARN sont prêts pour l'amplification. Le contrôle interne est soumis à l'intégralité de la procédure de préparation des échantillons, avec les calibrateurs, les contrôles et les échantillons.

❖ Préparation des réactifs et assemblage de la plaque de réaction

L'appareil Abbott m2000sp mélange les différents réactifs pour l'amplification Abbott RealTime HCV (HCV oligonucléotid réactif, thermostable rTth Polymérase Enzyme et Activation Réactif). Il pipette le master mix dans la plaque de réaction optique à 96 puits Abbott ainsi que des fractions aliquotées d'échantillons d'ARN préparés. Après avoir scellé la plaque optique manuellement, celle-ci est prête à être transférée sur le m2000rt.

❖ Amplification

Au cours de la réaction d'amplification sur m2000rt, l'ARN cible est converti en ADN c grâce à l'activité de reverse transcriptase de la polymérase thermostable rTth ADN.

Les étapes de transcription inverse et d'amplification se déroulent comme suit :

- Dénaturation de l'hybride ARN- ADNc sous l'effet de la température élevée (95°).
- Hybridation des amorces de transcriptase inverse et du contrôle interne (chacune marquée avec un fluorophore différent) avec leurs cibles respectives et s'étendent lors de la baisse de température (60°).
- L'activité de la polymérase de l'enzyme rTth permet l'allongement des amorces hybridées le long des matrices. Ainsi on obtient une molécule d'ADN double brin. La séquence cible de l'amplification se situe dans la région 5'(UTR) du génome du VHC.
- L'amplification exponentielle du produit est réalisée grâce aux cycles répétés et définis entre températures élevées et basses.

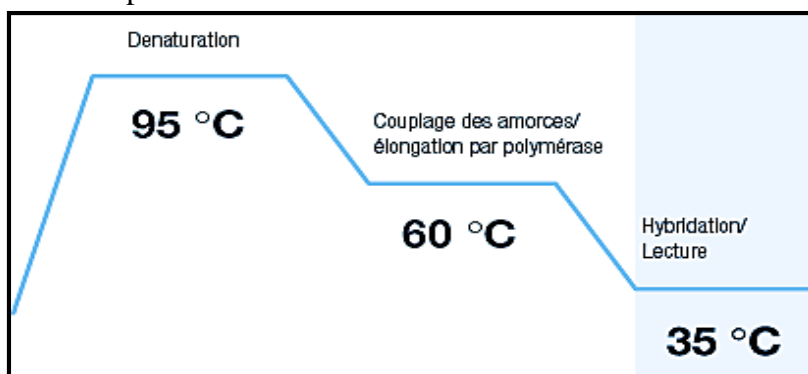


Figure 13 : Représentation des conditions de thermocyclage. (www.abbottmolecular.com, 2005).

❖ Détection

Pendant le cycle de lecture de l'amplification sur système Abbott m2000rt, la température est abaissée (35°) de manière à permettre la détection par fluorescence des produits (amplification

au cours de l'hybridation des sondes VHC et du contrôle interne avec leurs cibles (détection de fluorescence en temps réel).

L'hybridation des sondes avec des séquences complémentaires sépare le fluorophore du quencher et permet l'émission d'une fluorescence qui sera détectée (figure 22; B).

En l'absence de séquences cibles de VHC et de contrôle interne, la fluorescence des sondes est désactivée (figure 22; A).

Le cycle d'amplification au cours duquel le signal fluorescent est détecté par le m2000rt est proportionnel au logarithme de la concentration d'ARN VHC présente dans l'échantillon d'origine.

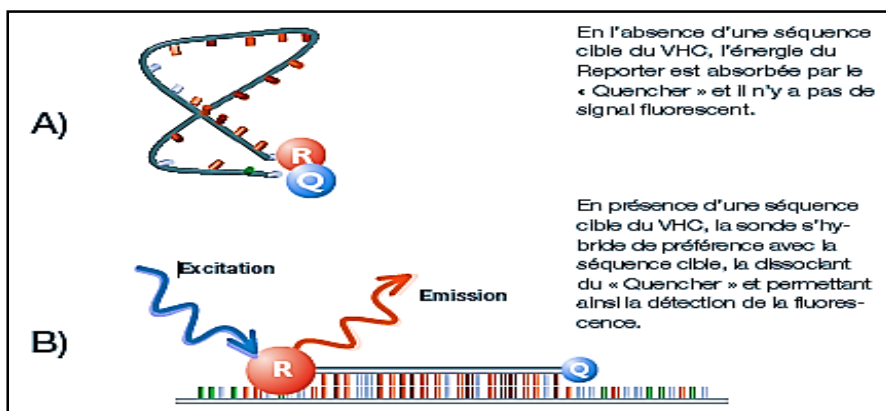


Figure 14 : Représentation des sondes d'ADN SS marquées par un fluorophore quencher et fluorophore rapporteur.

❖ Interprétation des résultats

La concentration en ARN viral du VHC d'un échantillon ou d'un contrôle est calculée à partir de la courbe de calibration enregistrée. L'appareil Abbott m2000rt rapporte automatiquement les résultats sur la station de travail du m2000rt.

II.3.c.3. Génotypage

Le test de génotypage du VHC est réalisé par la technique de « LINEAR ARRAY ». Ce test consiste en une hybridation inverse sur une bandelette LINEAR ARRAY après amplification par PCR. Ce test met en œuvre trois étapes principales réalisées en un ou deux jours.

a) Préparation des échantillons (manuelle)

L'extraction est faite à partir de sérums conservés à -20°C, selon le protocole COBAS AMPLICOR HCV 2.0 par lyse des particules virales à l'aide d'un agent chaotrope, puis par

précipitation de l'ARN par l'alcool. L'ARN est remis en suspension dans le diluant de l'échantillon.

b) Transcriptase inverse RT et Amplification par PCR (automatique)

La transcription inverse et l'amplification s'effectuent successivement au moyen du test COBAS^R AMPLICOR^R HCV v2.0 (**Roche diagnostics**). La première étape vise à produire l'ADNc et la deuxième étape a pour but d'augmenter le nombre de copies du produit de PCR afin d'avoir des résultats de génotypage fiables.

Ces deux opérations sont réalisées au moyen de l'enzyme thermostable ADN polymérase recombinante de *Thermus thermophilus* (*rTthpol*). En présence de manganèse (Mn²⁺) et dans des conditions tampon appropriées, la rTthpol exerce à la fois une activité de transcriptase inverse et d'ADN polymérase. Ceci permet à la transcription inverse comme l'amplification par PCR de s'effectuer dans le même mélange réactionnel.

c) Hybridation et détection

Une fois que le produit amplifié, est récupéré, le test de génotypage s'effectue sur des bandelettes LINEAR ARRAY de génotypage du VHC. Ceci s'effectue selon les étapes suivantes :

- Dénaturation des amplicons et hybridation des produits amplifiés avec des sondes oligonucléotidiques immobilisées sur les bandelettes de nitrocellulose spécifiques aux régions non traduites 5'-UTR des différents génotypes du VHC, puis addition du conjugué (Streptavidine-peroxydase de raifort).
- Après l'ajout d'une solution de substrat contenant du peroxyde d'hydrogène et du TMB (3,3', 5,5'- tétraméthylbenzidine) à chaque bandelette, une réaction enzymatique se déroule en présence de peroxyde d'hydrogène, la peroxydase de raifort liée, catalyse l'oxydation du TMB en formant un précipité de couleur bleu qui entraîne la formation d'une série de bandes visibles sur la bandelette de nitrocellulose.

Chapitre III

Résultats et discussion

III. Résultats et discussions :

Le nombre total des patients se présentant pour une quantification de la charge virale est de 270 (positifs pour la recherche des anticorps anti-VHC) parmi eux 173 patients VHC(+) sans pathologie associée et 97 patients VHC(+) hémodialysés.

Nous avons pu exploiter les paramètres suivants :

III.1.. Répartition des patients selon le sexe :

Sur les 173 patients VHC(+) sans pathologie associée on compte 85 de sexe féminin ce qui représente une fréquence de 49%, et 88 soit 51% de sexe masculin. Les 97 patients VHC(+) hémodialysés sont répartis en 49 patients de sexe féminin soit une fréquence de 51% et 48 soit 49% sujets de sexe masculin. Ces partitions sont représentés ci-dessous (figure 15).

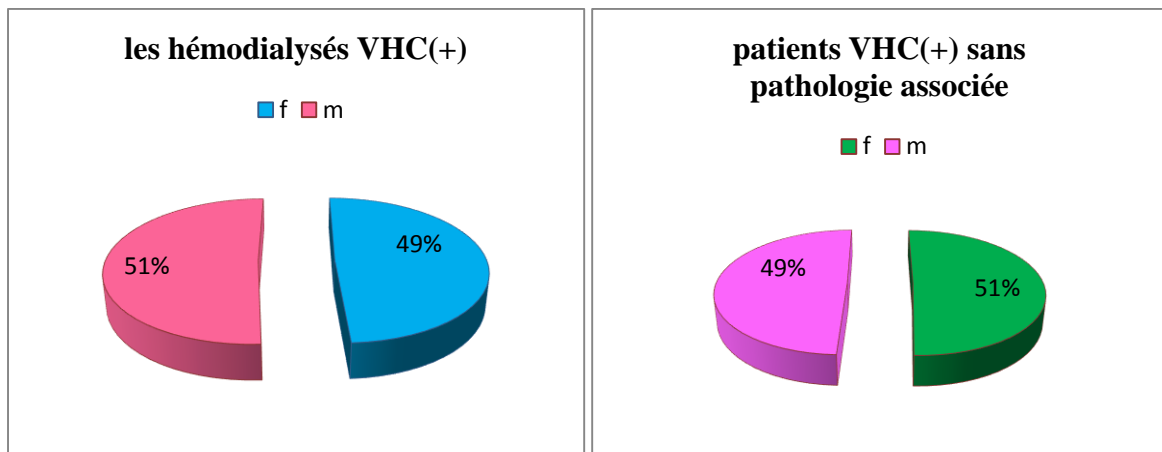


Figure 15 : répartition des patients selon le sexe chez des patients VHC(+) sans pathologie associée (n=173) et des patients VHC(+) hémodialysés (n=97).

III.2 Répartition des patients selon l'âge

Les hémodialysés infectés par le VHC sont âgés de 29 à 79 ans avec un âge moyen de 45.3 ans. La classe d'âges de 30 à 39 ans est la plus représentée (25%).

Les patients VHC(+) n'ayant aucune pathologie associée sont âgés de 20 à 89 ans avec un âge moyen de 51.49 ans, la classe d'âge de 50 à 59 est la plus représentée (23.71%).

16.27 % des patients VHC(+) sans pathologie associée et 22.68% des patients VHC(+) hémodialysés n'ont pas précisé leur âge dans les fiches de renseignement (figure 16).

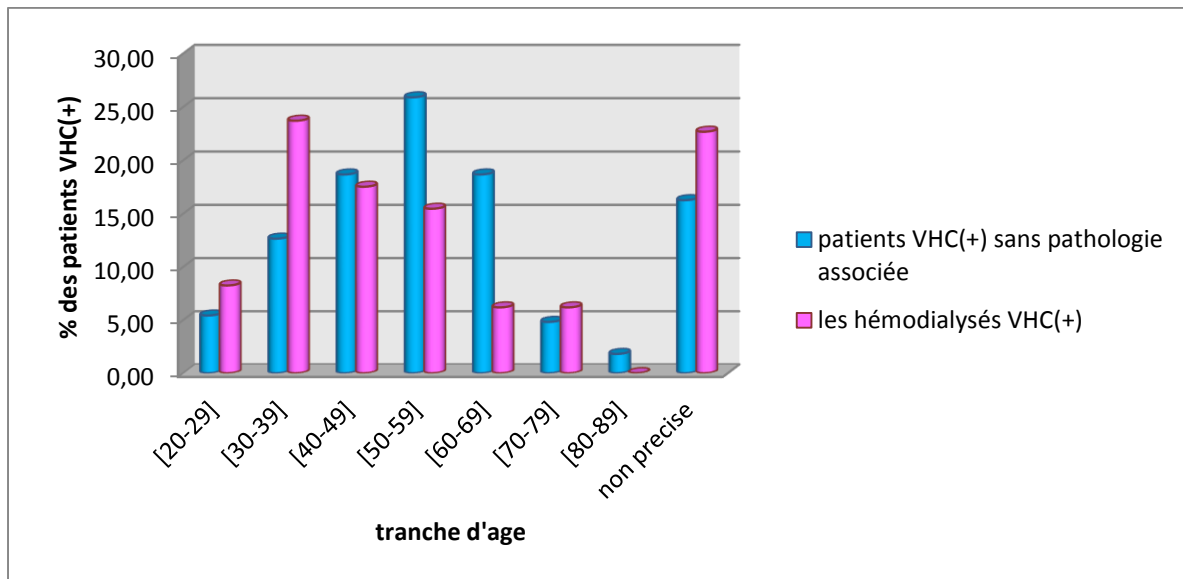


Figure 16: répartition des patients VHC(+) sans pathologie associée (n=173) et des patients VHC(+) hémodialysés (n=97) selon les tranches d'âge.

Les résultats obtenus montrent qu'il existe selon l'âge et le sexe une augmentation de la séroprévalence du VHC avec l'âge dans les deux populations. Cette augmentation est due d'une part à la persistance des anticorps anti-VHC après contamination chez les sujets immunocompétents 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 parcequ'elle est asymptomatique donc silencieuse; les personnes infectées peuvent rester sans symptômes pendant plus de 10 à 20 ans. Ceci explique la découverte de l'infection chronique à l'âge adulte notamment entre 40 et 59 ans.

Nos résultats concordent avec ceux trouvés par le Dr A Bensalem et al. 2011, ils ont constaté une augmentation de séroprévalence du VHC avec l'âge chez les hémodialysés, Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les sujets âgés mal suivies, ont généralement d'autres pathologies associées qui se déclarent avec l'âge (Diabète, HTA...) et évoluent vers l'insuffisance rénale terminale donc vers la dialyse.

On constate une nette diminution chez les hémodialysés à partir de 60 ans, Ceci est rapporté dans l'étude de Dr A Bensalem et son équipe et elle serait dû à la courte espérance de vie chez les hémodialysés. Une étude prospective réalisée au japon a montrée que la mortalité était significativement plus élevée chez les hémodialysés anti-VHC positifs que négatifs (Nakayama E, Akiba T, et al. 2000)

Il est cependant intéressant de remarquer qu'à partir des résultats indiqués dans notre étude aucun enfant n'est confirmé positif, ce qui signifie que la prévalence de l'infection à VHC est faible chez l'enfant et augmente chez l'adulte jeune (Madhava *et al.*, 2002). Cette faible proportion peut s'expliquer par le fait que la transmission materno-fœtale est faible elle est de 5% et la faible exposition aux autres modes de transmission à cet âge (Desenclos *et al.*, 1994).

III.3. Répartition selon les génotypes :

Le génotypage montre que le génotype 1 est majoritaire, 45% chez les patients VHC(+) sans pathologie associée, suivi du génotype 2 (19%). Les autres types identifiés sont moins fréquents, le génotype 3 (5%) et le génotype 4 (2 %) par contre les génotypes 5 et 6 n'ont pas été détectés au sein de notre population. 29% des patients sans pathologie associée, leur génotype est indéterminé.

Chez les patients hémodialysés VHC(+) le génotype 1 est dominant (16%) suivi du génotype 2 (7%). Les autres types sont moins fréquents, 2% pour le génotype 3 et 1% pour le génotype 4 et les génotypes 5 et 6 n'ont pas été détectés. 74% des patients hémodialysés VHC(+), leur génotype est indéterminé (Figure 17).

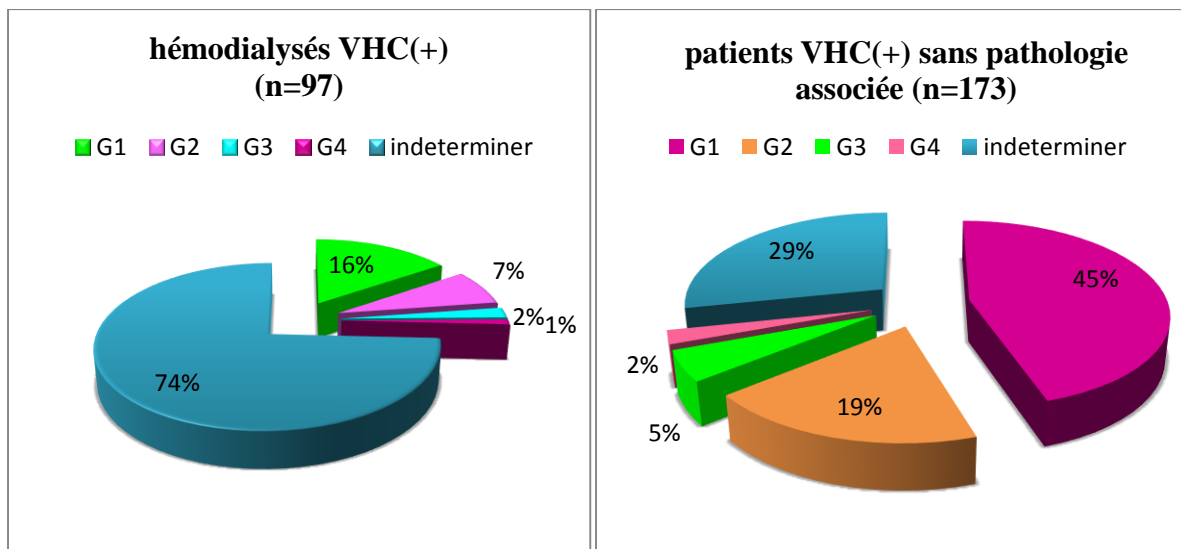


Figure 17 : répartition des patients VHC(+) sans pathologie associée (n=173) et des patients VHC(+) hémodialysés (n=97) selon les génotypes.

Nos résultats concordent avec une étude qui a été faite en 2009 par Ouldgougam, sur 779 patients atteints d'hépatite C au service de gastro-entérologie de Bologhine (Alger), dans laquelle il a révélé la prédominance du génotype 1 (72%).

La distribution de ces génotypes est comparable à celle trouvée au Maroc, 47% pour le génotype 1 et 29% pour le génotype 2 (Cacoub *et al*, 2000) et à celle trouvée en Tunisie, 71% pour le génotype 1 (Ayed K., Gorgi Y *et al*.2002) et à l'Ouest de l'Europe (Takada *et al*, 1992 ; Halfon *et al*, 1997).

Deux génotypes G5 et G6 n'ont pas été détectés dans notre population, cela est dû probablement à la concentration de ces deux génotypes dans des régions bien spécifiques dans le monde. Le génotype 5 est particulièrement localisé en Afrique du sud tandis que le génotype 6 circule dans les pays du Sud-Est asiatique (Nicot *et al*, 1997; Gaudy et Goudeau, 2005).

La détermination du génotype est indispensable. Le génotype conditionne les indications du traitement, les modalités du bilan pré-thérapeutique et la stratégie thérapeutique elle-même.

Bien que cette répartition des génotypes concorde avec les études faites précédemment en Algérie. Il faut que nous signalons que le manque de renseignements cliniques reste un grand handicap pour les études épidémiologiques. Il faut qu'il y est une collaboration étroite entre biologistes et cliniciens.

III.4. Répartition des patients selon le stade de traitement

Le tableau II et III suivants représentent la répartition des patients en fonction de la durée du traitement selon respectivement l'effectif et le génotype viral.

Tableau II : répartition des patients en fonction de leur nombre par stade du traitement.

stade de traitement	patients VHC(+) sans pathologie associée		Patients VHC(+) hémodialysés	
	Effectif	%	Effectif	%
BPT	101	37.13	49	41.18
3 mois de traitement	46	16.91	18	15.13
6 mois de traitement	64	23.53	28	23.53
12 mois de traitement	36	13.24	17	14.29
6 mois après arrêt de traitement	25	9.19	7	5.88
Total	272	100	119	100

Tableau III : répartition des patients en fonction des génotypes et du stade du traitement.

Contexte de la prescription	Patients VHC pathologie(+) sans associée		Hémodialysés VHC(+)	
	G1, 4	G2, 3	G1, 4	G2, 3
BPT	66	31	14	9
3mois de traitement	15	2	2	1
6mois de traitement	18	10	3	1
12mois de traitement	12	1	2	0
6 mois après arrêt de traitement	6	6	0	0
Total	117	50	21	11

Afin d'assurer une meilleure surveillance des malades traités, une classification spécifique nous a semblé nécessaire en fonction des différents stades du traitement selon les recommandations du consensus international suivi en Algérie et qui recommande cinq PCR dans le suivi thérapeutique (quantifier la charge virale en bilan pré-thérapeutique 3/ 6/ 12 et 6 mois après arrêt du traitement) pour le génotype 1 et quatre PCR (quantifier la charge virale en bilan pré-

thérapeutique 3/ 6 et 6 mois après arrêt du traitement) pour le génotype 2. Les résultats obtenus (tableau II) indiquent la présence d'une fluctuation du nombre des patients d'un stade de traitement à l'autre, cela est dû à plusieurs obstacles au cours du suivi. parmi lesquels la distance entre le lieu de résidence et l'IPA lieu d'analyse, en tenant compte aussi de la qualité de vie qui les empêche de se déplacer ou de payer le test de PCR sachant qu'il est cher et que par fois il est difficile d'obtenir les prises en charges bien qu'elle soit un droit pour les patients..

En outre, la quantification de la charge virale ou le génotypage en dehors de l'IPA (organismes externes) est aussi l'une des raisons de la différence de l'effectif d'un stade à l'autre.

Il est recommandé avant toute mise en place d'un traitement chez un sujet ayant une infection chronique par le VHC de pratiquer un génotypage notamment pour l'adaptation des doses et la durée des traitements. Pour les patients de génotype 2 et 3, la durée du traitement est de 24 semaines contre 48 semaines pour les patients de génotype 1, 4, et 5 (Chevaliez, 2008).

Dans le cadre d'un suivi du traitement de l'hépatite virale C pour 99 patients (79 patients infectés par le VHC n'ont aucune pathologie associée contre 20 patients hémodialysés infectés par le VHC. Pour une meilleure évaluation de l'intérêt du génotypage et de la quantification du VHC, une analyse des différentes charges virales obtenues pour l'ensemble des patients a été réalisée.

Afin de faciliter l'interprétation de nos résultats, nous avons regroupés les deux types des patients étudiés en deux groupes :

- Groupe 1 ; pour les patients VHC(+) hémodialysés.
- Groupe 2 ; pour les patients VHC(+) sans pathologie associée.

a) Patients au stade pré-thérapeutique

Le tableau IV et la figure 18 illustrent le niveau de la charge virale des patients VHC (+) hémodialysés (groupe 1) et les patients VHC(+) sans pathologie associée (groupe 2) au stade pré-thérapeutique.

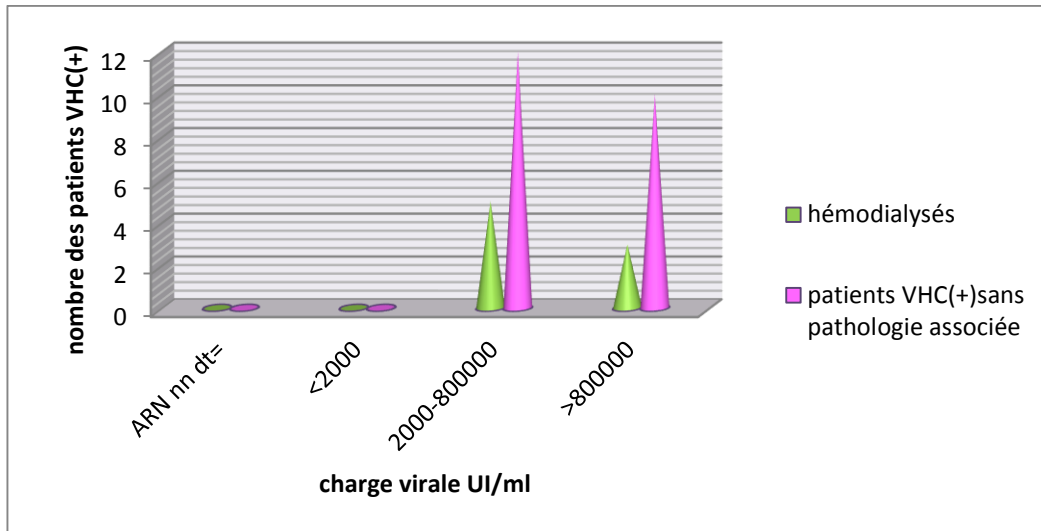


Figure 18. Répartition du niveau ou taux de la Charges virales, dans les deux groupes, quantifié par PCR en temps réel au stade pré-thérapeutique.

Selon les résultats obtenus (Tableau IV), nous constatons que parmi un ensemble de 22 patients sans pathologie associée et 8 patients hémodialysés adressés pour un bilan pré-thérapeutique :

Il y a une fluctuation dans les valeurs des charges virales dans le bilan pré thérapeutique trouvées: la valeur la plus élevée chez les patients VHC(+) sans pathologie associée était de 14100000 UI/ml, alors que chez les hémodialysés VHC(+) était (plus élevée) de 3850000 UI/ml.

- Un ensemble de 13 patients (3 chez le groupe 1 et 10 chez le groupe 2), ont une charge virale au-dessus de 800000 UI/ml.
- 17 patients (5 chez le groupe 1 et 12 chez le groupe 2), ont une charge virale se situant dans un intervalle de [2000 UI/ml - 800.000 UI/ml].
- aucun patient n'a une charge virale au-dessous de la limite inférieure à 2000 UI/ml (Valeur à partir de laquelle l'indication du traitement est posée) ou l'ARN est indétectable.

b) Patients à 3 mois de traitement

Les mesures de la charge virale des différents patients à 3 mois de traitement sont représentées dans le tableau V et la figure 19

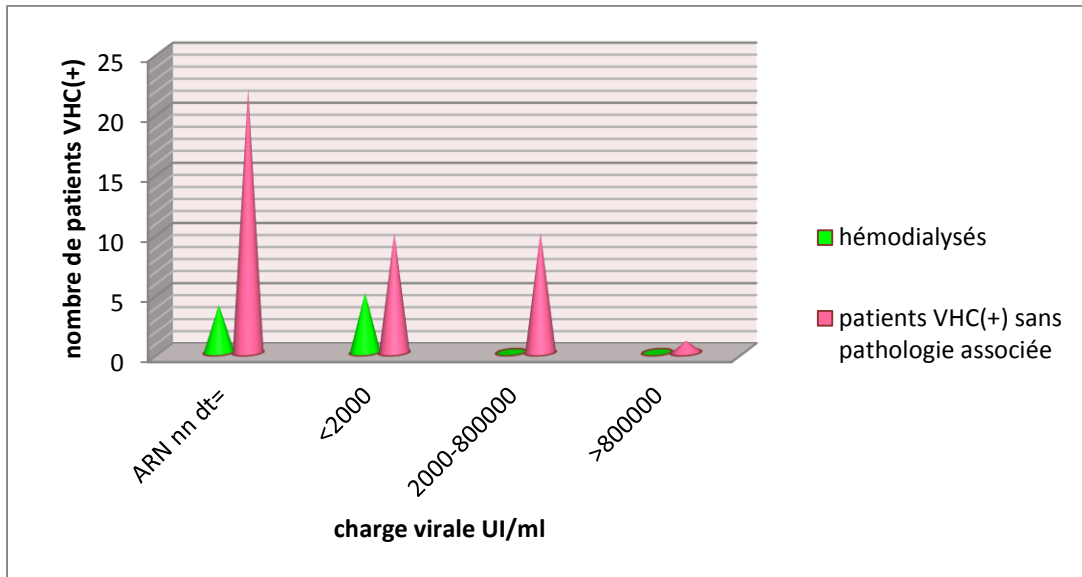


Figure 19. Répartition des patients VHC(+) selon la variation de la Charge virale à 3 mois de traitement.

- 4 patients sur 9 de groupe 1, et 22 sur 43 du deuxième groupe chez qui nous n'avons eu aucun taux d'ARN détecté donc ces patients ont une réponse virologique précoce.
- 5 patients sur 9 du groupe 1, et 10 sur 43 du groupe 2 ont une charge virale inférieure à 2000 UI/ml.
- 10 patients du groupe 2 présentent une charge virale située dans l'intervalle de quantification (2000UI/ml - 800.000 UI/ml).
- Alors que 1 seul patient du groupe 2 présente une charge virale supérieure à 800000UI/ml.

c) Patients à 6 mois de traitement

Le tableau VI et la figure 20 illustrent les mesures de la charge virale des patients VHC (+) hémodialysés (groupe 1) et les patients VHC(+) sans pathologie associée (groupe 2) à six mois de traitement.

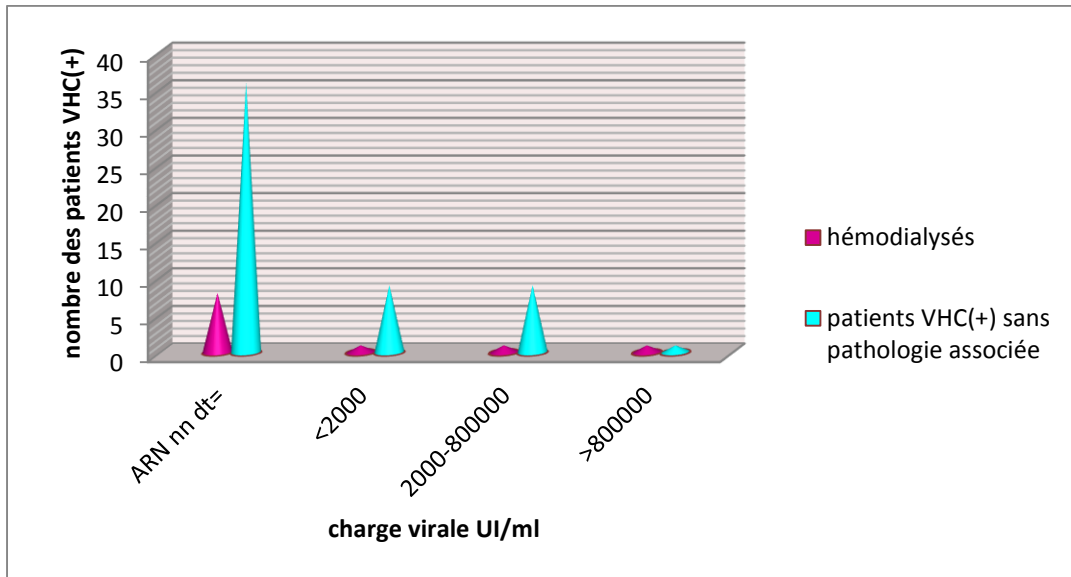


Figure 20. Répartition des patients VHC(+) selon la variation de la Charge virale à 6 mois de traitement.

- La majorité des patients de groupe 1 et de groupe 2 (8/11 et 36/55) respectivement à 6 mois de traitement, présentent une charge virale non détectable ce qui signifie qu'ils ont une bonne réponse au traitement (réponse virologique rapide).
- 23 patients ont des charges virales détectables, allant de 16UI/ml jusqu'à 2410000 UI/ml pour le groupe 1, et de 13 UI/ml jusqu'à 1427481 UI/ml chez les patients de groupe 2.

d) Patients à 12 mois de traitement

Les mesures de la charge virale des différents patients à 12 mois de traitement sont représentées dans le tableau VII et la figure 21.

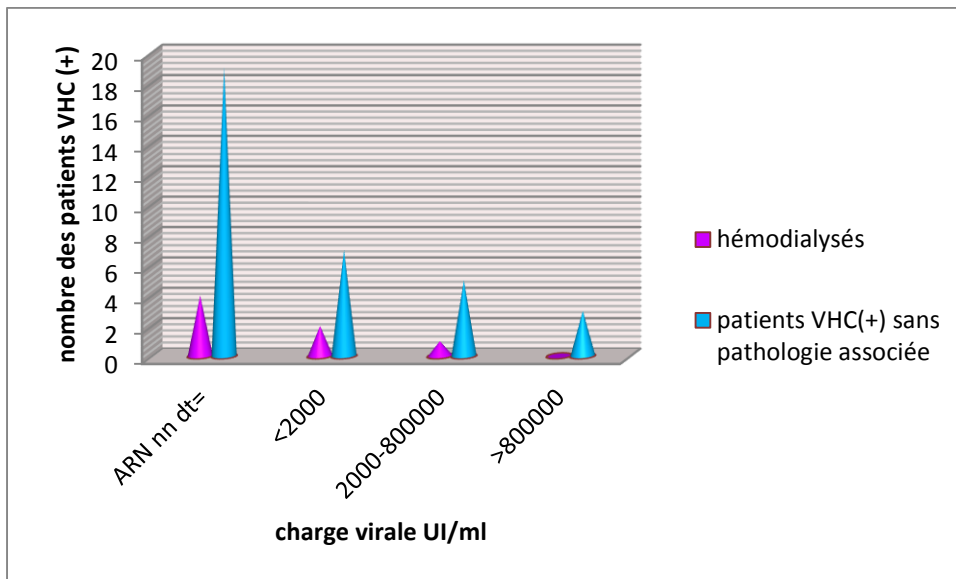


Figure 21. Répartition des patients VHC(+) selon la variation de la Charge virale à 12 mois de traitement.

- 4 patients du 1^{er} groupe et 19 patients du 2^{ème} groupe ont une charge virale non détectable. Tandis que le reste des patients présente des charges virales fluctuantes, la plus élevée est de 1940000 UI/ml alors que la plus basse est de 24 UI/ml.

e) Patients à 6 mois après arrêt de traitement

Les mesures des charges virales des patients à 6 mois après fin de traitement, sont représentées dans le tableau VIII et la figure 22.

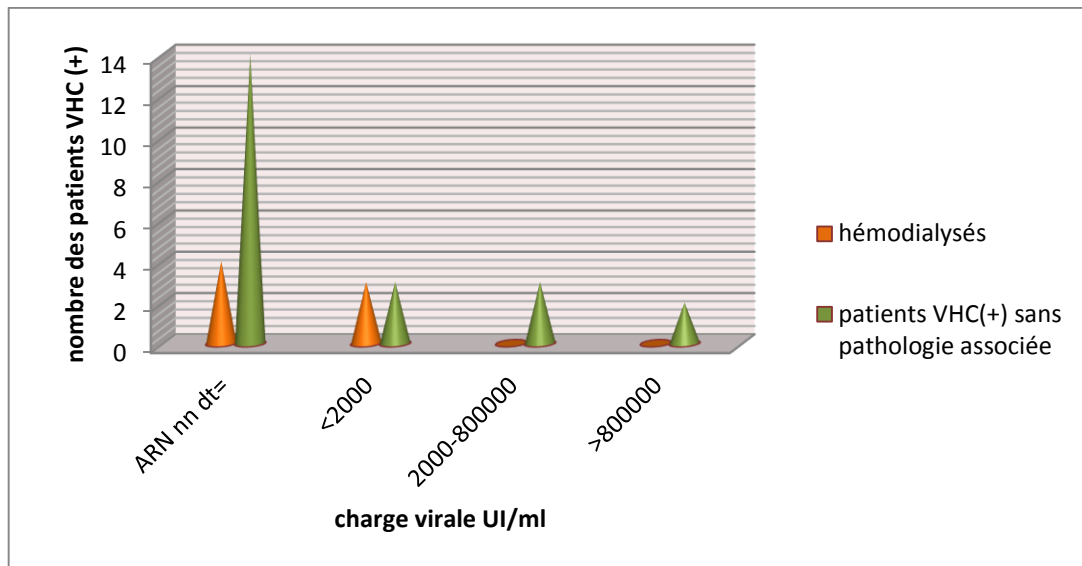


Figure 22. Répartition des patients VHC(+) selon la variation de la Charge virale 6 mois après arrêt de traitement.

- Six mois après fin de traitement on a trouvé que 4 sur 7 patients de groupe 1, présentent une charge virale non détectable. Alors que chez 14 sur 22 patients de groupe 2, la charge virale est non détectable.
- Pour le groupe 1, nous avons noté 3 patients qui ont eu une réapparition de l'ARN viral dans les 6 mois qui ont suivi l'arrêt du traitement, à l'instar de 8 patients dans le deuxième groupe.

III.5. Répartition des patients selon la réponse au traitement

Il s'agit de juger de la différence, entre les patients hémodialysés VHC(+) et les patients VHC(+) sans pathologie associée, dans la réponse au traitement chez 99 patients suivis, Pour ce but nous avons utilisé le test χ^2

Tableau IX. Répartition des patients selon la réponse au traitement.

réponse au traitement	hémodialysés		Patients VHC(+)	
	effectifs n	%	effectifs n	%
bons répondeurs	16	80	60	75,95
mauvais répondeurs	3	15	17	21.52
rechuteurs	1	5	2	2.53
totale	20	100	79	100

Le test de χ^2 de la réponse en fonction du type de patients, est non significatif ($\chi^2=0,149$; $p=0,93 \gg 0,05$). Ceci signifie que la réponse au traitement reste globalement semblable pour les deux catégories de malades étudiés.

En raison du manque de renseignement cliniques et afin de compléter les résultats obtenus, nous avons classés nos patients selon d'autre critère de réponse au traitement antiviral qui sont les différents types de réponse au traitement (RVP, RVS, non répondeur, rechute).

III.6. Répartition des patients selon le type de réponse au traitement

La figure 23 représente la répartition des patients VHC(+) (les deux groupes) selon le type de réponse virologique au traitement qui sont les différents type de réponse virologique au traitement (RVP, RVS, non réponse et rechute).

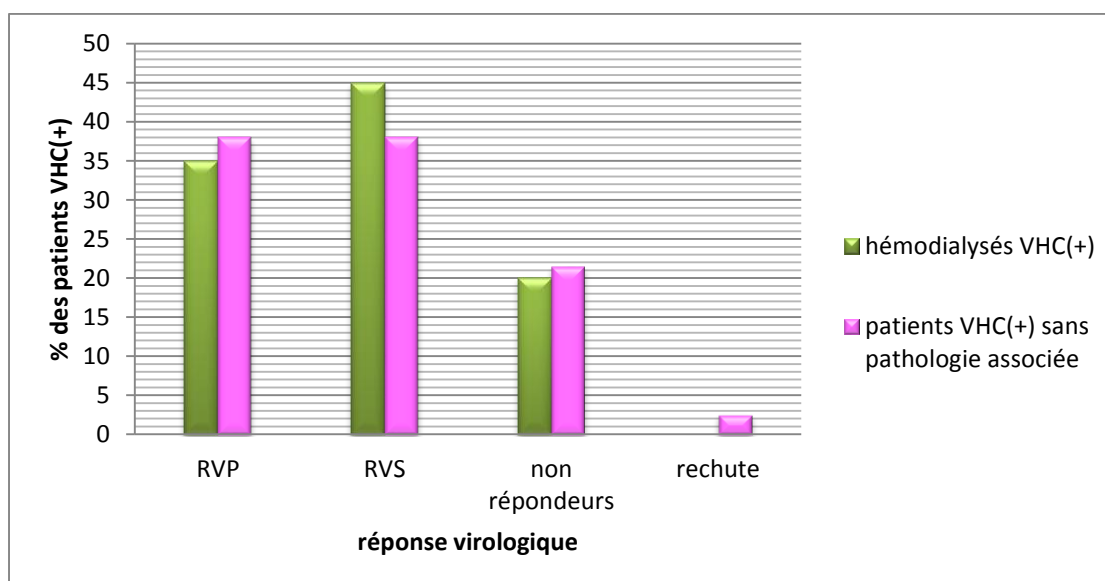


Figure 23. Répartition des patients selon la réponse virologique.

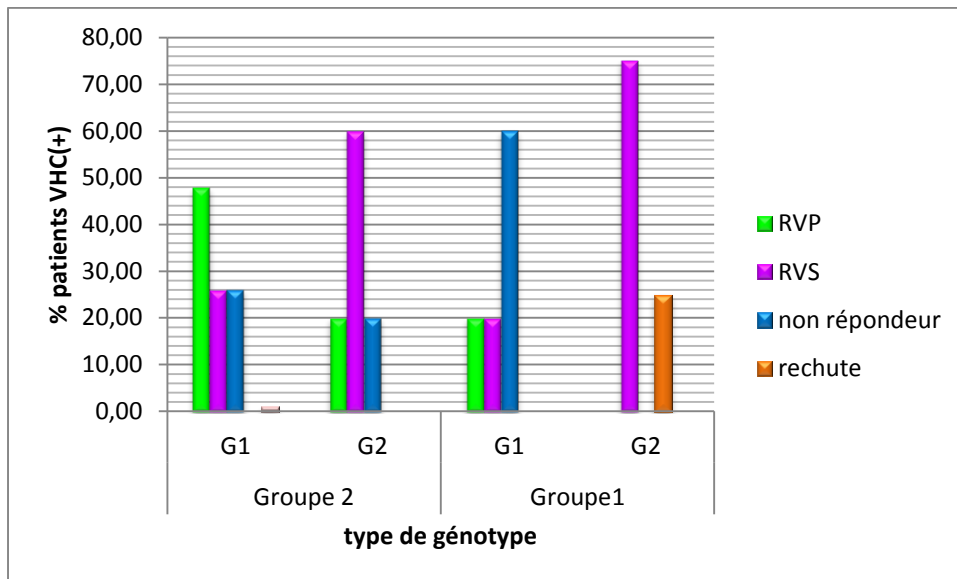


Figure 24. Répartition des patients selon les génotypes.

- Le taux de RVS est 75% et 60%(groupe 1 et groupe respectivement) chez les patients infectés par le génotype 2 tandis que chez les patients infectés par le génotype 1 est 20% et 26%(groupe 1 et groupe 2 respectivement).

Il n'existe pas de consensus actuel pour définir le seuil discriminant une virémie basse d'une virémie élevée. De plus, il existe une variabilité intra-individuelle qui pourrait justifier la répétition des mesures en cas de virémie à la limite du seuil choisi (800 000 UI/mL), et une variabilité entre les différentes techniques de quantification de l'ordre de 10-15 %. Par conséquent, malgré la standardisation en unités internationales de la charge virale C, les patients doivent être suivis à l'aide d'un même test de quantification (halfon P, Penarranda G et al.2006).

Quel que soit le génotype, la réponse au traitement (disparition de l'ARN viral) doit être évaluée à la fin du traitement et 6 mois après son arrêt par une technique qualitative sensible (PCR en temps réel).

La non réponse se définit par la persistance de l'ARN viral sérique en fin de traitement (24 semaines pour les génotypes 2/3) et (48 semaines pour les génotypes 1/4).

En effet chez un sujet ayant des anticorps anti-VHC détectés, il est impératif de rechercher une réplication virale par la détection qualitative de l'ARN du VHC dans le sérum.

Ainsi l'absence de réplication virale témoigne d'une infection guérie. Alors qu'une réplication virale mise en évidence, est signe de présence d'une infection par le VHC.

Patients au stade pré-thérapeutique (figure 18)

L'intérêt de la quantification de l'ARN du VHC lors du bilan pré-thérapeutique est indispensable. En effet, cette mesure permet non seulement d'évaluer le risque de bonne ou mauvaise réponse au traitement mais aussi de disposer d'un niveau de base utile pour un suivi à long terme.

62.5% et 54.55% des patients du groupe 1 et groupe 2 respectivement ayant une charge virale pré-thérapeutique basse (<800000UI/ml) ont une probabilité plus élevée d'avoir une réponse virologique précoce que les patients (37.5% du groupe 1 et 45% du groupe 2) ayant une charge virale élevée (selon Jensen et al, 2006). Cependant des valeurs de la charge virale même élevées ne sont pas corrélées à la sévérité de l'atteinte hépatique (Pawlotsky, 2002).

Nos résultats montrent que la charge virale est plus faible chez les patients hémodialysés que chez des patients sans pathologie associée et cela concorde avec l'étude de Rampino T et al.1999. Ceci peut être dû à l'effet immunosuppresseur de l'urémie chronique, au passage du VHC par le dialysat (Lombardi M,et al.1995, Valtuille R et al.1998) ou à la destruction du virus lors du passage à travers la membrane de dialyse sous l'effet de la pression exercée sur le dialysat (Okuda K et al.1996)

Il apparaît clairement aujourd'hui que les 4 premières semaines de traitement sont décisives pour la réponse virologique ultérieure. L'observance durant cette période de traitement est fondamentale, ainsi que l'évaluation de la décroissance virale dans les 4 premières semaines permet d'individualiser et d'optimiser le traitement antiviral C (Fried *et al*, 2008; Ouzan, 2007). Mais nous n'avons pas pu inclure ce stade de traitement à notre étude parce que nos patients ont suivis l'ancienne stratégie thérapeutique qui commande une quantification d'ARN virale après trois mois de traitement.

Patients à 3 mois de traitement (figure 19)

Parmi les patients du groupe 1, 44.44% des cas ont une charge virale indétectable au bout de trois mois de traitement. Les patients du groupe 2 dont la charge virale était devenue négative représentent 51.16%.

Ceci est dû à l'effet du traitement qui sert à la diminution de la charge virale de 2 log ou à sa disparition. Dans ce cas, les chances de guérison sont élevées mais le traitement doit être poursuivi (Pawlotsky, 2002).

25.59% des patients ont un ARN virale détectable au bout de trois mois de traitement et selon Ghany M et son équipe ils sont considérés comme des bons répondeurs.

Patients à 6 mois de traitement (figure 20)

La majorité des patients hémodialysés 72.73% ainsi que les patients sans pathologie associée à 6 mois de traitement, présentent une charge virale indétectable ce qui signifie qu'il y a eu bonne réponse au traitement, Cela serait probablement dû à l'éradication virale au cours de la période du traitement. Quel que soit le génotype, l'efficacité thérapeutique (disparition de l'ARN viral) doit être évaluée 12 semaines après l'arrêt du traitement.

Une diminution significative sans disparition de l'ARN à la semaine 24 pourrait suggérer à augmenter les doses de traitement (en fonction du génotype), à condition que ce traitement soit bien toléré. L'augmentation de la durée du traitement en fonction du délai d'obtention d'une virémie indétectable devrait permettre d'obtenir une efficacité maximale du traitement (Ouzan, 2007).

Patients à 12 mois de traitement (figure 21)

La charge virale à 6mois de traitement pour 57.14% des patients de groupe 1, alors que 55.88% des patients du groupe 2, montre une charge virale nulle. Cela indique que les deux groupes répondent au traitement. Pour ces patients, un contrôle sera fait 6mois après arrêt du traitement. Les autres patients présentent des charges virales variables. Ils sont considérés comme des « non répondeurs ». De nombreuses études suggèrent une prolongation du traitement de 48 jusqu'à 72 semaines chez les patients infectés par le génotype 1, ayant une réponse virologique précoce (c'est à dire négative à 12 semaines de traitement), la probabilité d'avoir une réponse virologique prolongée, (guérison) serait alors supérieure de 50% (Marcellin, 2009).

6mois après l'arrêt de traitement (figure 22)

La disparition de l'ARN-VHC indique réellement la guérison chez 57.14% des patients de groupe 1 contre 63.64% des patients de groupe 2, il s'agit d'une réponse virologique prolongée soutenue. Marcellin, 2009 avait démontré dans son étude que l'infection virale était définitivement éradiquée dans la plupart des cas.

La réponse au traitement

Plusieurs types de réponses virologiques peuvent être observés au cours du traitement et serviront d'outils décisionnels pour la durée totale de la thérapie.

Nos résultats se rapprochent à l'étude qui a été fait par Asselah T et son équipe en 2010, il a montré que PEG-IFN et ribavirine induit une RVS chez les 80% des patients infectés par le génotype 2 ou 3, et seulement 50% des patients de génotype 1 présentent une charge virale indétectable.

49% et 20% des patients (groupe 1 et groupe 2 respectivement) infectés par le génotype 1 et 20% par le génotype 2 ont une réponse virologique précoce, selon Ghany M et son équipe a montrés que la RVP est prédictive de RVS (réponse virologique soutenue) (Ghany M et al.2011)

Nos résultats s'accordent à l'étude de Moucari R, Asselah T et al en 2008 qui ont constatés un ensemble des facteurs prédictifs à la réponse au traitement avec PEG-IFN et ribavirine qui sont liés soit au virus :

- Génotype non-1(75% et 60% du groupe 1 et 2 respectivement infectés par le génotype 2 ont eu une réponse au traitement).
- charge virale faible (62% et 54% des patients du groupe 1 et 2 respectivement ont une charge virale pré-thérapeutique < 800000UI/ml).

Soit au malade :

- sexe féminin (45.45% seulement de sexe féminin qui ont répondu au traitement antiviral probablement du a des facteurs externes tels que la prise irrégulière ou parfois l'arrêt prématuré du traitement).
- âge jeune (46.22 ans est la moyenne d'âge des patients répondus au traitement).
- Fibrose minime (pas étudié au sain de notre population).

A part les facteurs bien connus, des travaux récents ont montré que la séquence du génome viral ainsi que des facteurs génétiques de l'hôte jouent un rôle important (Aurora R, Donlin MJ et al.2009).depuis 2009, différentes équipes ont décrit plusieurs mutations ponctuelles dans la même région en amont du promoteur de l'IL-28B, associées à la réponse au traitement (Asselah T et al.2010- Ge D, Fellay J et al.2009), ils ont notamment démontré que des polymorphismes du gène IL28B, codant pour l'IFN-lambda étaient hautement prédictifs pas seulement de la réponse au traitement mais aussi de l'élimination spontanée du virus dans la phase aiguë de l'infection (Ge D, Fellay J, Thompson AJ, et al.2009). Le mécanisme précis par lequel ce polymorphisme est associé à la réponse n'est pas actuellement élucidé.

21.21% des patients sont considérés comme non répondeurs, et ceci pourrait être du à la stabilisation du complexe protéique du VHC selon Aurora R et son équipe qui ont trouvés que la séquence d'acide aminée du virus des non répondeurs présente trois acides aminées en plus que la séquence des répondeurs

Les échecs thérapeutiques peuvent être dus à deux situations bien différentes susceptibles de conditionner la stratégie thérapeutique future à adopter chez un malade qui sont la véritable résistance virologique qui est trouvée chez environ 12 % des patients naïfs (Zeuzem S, Pawlotsky JM et al.2005), et le traitement insuffisant (co-morbidité, traitement par monothérapie, réduction des doses, arrêt prématuré...). En effet, certaines caractéristiques cliniques des malades comme le surpoids, l'insulino résistance et la consommation chronique d'alcool pourraient avoir un impact négatif sur la réponse au traitement.

Conclusion générale

Conclusion générale

L'hépatite virale C demeure la principale infection virale chez les hémodialysés chroniques. Elle constitue clairement un problème de santé publique dans cette population par sa prévalence élevée.

Dans ce travail nous avons comparé la réponse au traitement antiviral dans deux populations différentes infectées par le VHC (les hémodialysés et les patients sans autre pathologie associée) et nous avons retrouvé que la réponse était comparable.

Le suivi thérapeutique des patients nous a permis d'évaluer la virémie et son éradication au cours du traitement. Nous avons pu ainsi réaliser que plusieurs facteurs peuvent influencer la réponse au traitement, tels que le génotype viral, l'âge, le sexe des patients et de surcroît les Co-morbidités. Notre analyse a permis de ressortir des résultats suivants :

Les patients infectés par le génotype 2 et les patients ayant une charge virale pré-thérapeutique faible ont une réponse au traitement, ainsi que la moyenne d'âge jeune de nos patients était un facteur de la bonne réponse au traitement.

Nous avons trouvé que le sexe féminin qui est considéré par d'autres études autant qu'un facteur influençant la réponse au traitement n'était pas assez significative dans notre population et cela est probablement à des facteurs externes liées au mode de vie de ces femmes et à la prise du traitement.

Nous avons pu comparer nos résultats à d'autres études, et d'après les données mentionnées précédemment, nous pouvons conclure que le traitement de l'hépatite C est liée à la détermination des facteurs prédictifs, en effet on pourrait prévenir le risque de l'échec thérapeutique en prenant en charge les co-morbidités comme l'obésité, l'alcoolisme et les problèmes psychiatriques avant la mise en route d'un traitement antiviral; et en améliorant l'observance du traitement par informer le malade et sa famille sur les effets secondaires cliniques en les prenant en charge rapidement dès qu'ils surviennent et en dépistant rapidement une éventuelle résistance au traitement par une surveillance virologique du génome. Il est probable que dans le futur on adaptera le traitement selon des facteurs génétiques du patient aussi.

La technologie de PCR en temps réel est aujourd'hui l'outil de choix qui permet de quantifier le génome viral du VHC. La spécificité, la sensibilité, la bonne reproductibilité et la linéarité sur une gamme dynamique très large sont les performances de cette technique.

Nous avons utilisé deux trousse de quantification de l'ARN VHC (Cobas Ampliprep/ Cobas TaqMan et Abbott RealTime VHC) actuellement disponibles au laboratoire des hépatites au sein de l'IPA, qui présentent d'excellentes performances analytiques. Avec des charges virales quantifiées respectivement ($85,2 \cdot 10^6$ UI/ml versus 15 UI/ml et $1 \cdot 10^8$ UI/ml versus 12 UI/ml), elles permettent une quantification exacte de fortes charges virales, comme des plus faibles (seuil de sensibilité très bas).

Il faut ajouter également à leurs nombreuses, performances, la rapidité d'exécution sans étape post-PCR. Nous avons pu apprécier le fait que la méthode soit automatisable, et par conséquent parfaitement adaptée à une analyse de routine, elle permet d'obtenir des résultats en moins de 24 heures à l'opposé de la PCR conventionnelle qui nécessite un délai de 3 jours. Par ailleurs, la réaction s'effectuant en tube fermé diminue considérablement le risque de contamination.

Enfin, il nous semble important d'améliorer les procédures d'obtention des prises en charge par le malade, en raison du prix exorbitant, ainsi que l'établissement d'un fichier pour chaque malade regroupant l'ensemble des informations autour du patient et sont état clinique avec la rigueur dans la communication de ces renseignements particulièrement pendant le suivi thérapeutique.

Références

bibliographiques

Asselah T, Estrabaud E, Bieche I, Lapalus M, De Muynck S, Vidaud M, et al. Hepatitis C: viral and host factors associated with non-response to pegylated interferon plus ribavirin. *Liver Int.* 2010 à paraître.

Autora, Donlin MJ, Cannon NA, et al, genome Wide hepatitis amino acid covariance networks can predict response to antiviral therapy in humans, *J clin Invest* 2009 ;119 :225-36.

Ayed K., Gorgi Y., Ben Abdallah T., Makni H.: Les infections par le virus C dans les centres d'hémodialyses en Tunisie : Etude sérologique et moléculaire : VIIème Congrès National de la Société Tunisienne de Gastro-enterologie (S.N.T.G.E) Tunis 2002 : C35-58

Bensalem A., Soltani M., Hihhi N., Mostefaoui F., Dahmani O., Kerioui C., Seghier M. Prévalence des hépatites virales B et C dans les centres de dialyses en Algérie, Institut Pasteur Algérie. *IVèmes Journées Nationales d'Hygiène Hospitalière, mai 2011*

Berke G, (1995). The CTL's kiss of death. *Cell*, 81:9-12.

Brass, V., Bieck, E., Montserret, R., Wolk, B., Hellings, J.A., Blum, H.E., Penin, F., and Moradpour, D. (2002). An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus

Brenard R., Michielsen P., Bourgeois N., De Galocsy H., Hépatite C: dépistage, traitement et prévention. Recommandations pratiques – résumé. *Revue Méd Gén.* 205 : 312-7, 2003.

Cacoub P., Ohayon V., Sekkat S., Dumont B., Sbai A and Lunel F. Epidemiologic and virologic study of hepatitis C virus infection in Morocco. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 24: 169-173, 2000.

Carrere-Kremer, S., Montpellier-Pala, C., Cocquerel, L., Wychowski, C., Penin, F., and Dubuisson, J. (2002). Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *Journal of virology* 76, 3720-3730.

Cernescu C, Ruta S, Gheorghe L, Iacob S, Popescu I, Wanless R-S. The Flying Publisher Guide to Hepatitis C Treatment. Flying Publisher & Kamps. 2011; P 32.

Chevaliez S. Tests virologiques dans les hépatites B et C. *Hépatogastro*, 15, 5 ; 345-353, 2008.

Choo, Q. L., G. Kuo, A. J. Weiner, L. R. Overby, D. W. Bradley, and M. Houghton. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244:359-62.

Colin C., Lanoir D and Touzet S. et al. Sensitivity and specificity of third generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature. *J Viral Hepat*, 8: 87-95, 2001.

Desenclos J. C., Dubois F., Couturier E., Pillonel J., Rudot-thoraval F., Guignard E., Brunet J. B and Drucker J. Estimation du nombre de sujets infectés par le V.H.C, en France : *5(96) : 22-23, 1994-1995*

Desenclos J. C., Dubois F., Couturier E., Pillonel J., Rudot-thoraval F., Guignard E., Brunet J. B and Drucker J. Estimation du nombre de sujets infectés par le V.H.C, en France : *5(96) : 22-23, 1994-1995.*

Durocher A and Dosquet P. Diagnostic et suivie virologique des hépatites virales. *Gastroenterol Clin Biol. 27 : 177-200, 2003.*

Egger D., Wolk B., Gosert R., Bianchi L., Blum H. E., Moradpour D. and Bienz K. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol. 76(12): 5974-84, 2002.*

Fofana I. Prévention de la réinfection par le virus de l'hépatite C lors de la transplantation hépatique par l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-récepteur, *2010.*

Frank C., Mohamed M. K., Strickland G. T., Lavanchy D., Arthur R. R., Magder L. S., El Khoby T., Abdel-Wahab Y., AlyOhn E. S., Anwar W. and Sallam I. The role of parenteral antisc. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol. 77(9): 5487-92, 2000*

Friebe P., Lohmann V., Krieger N. and Bartenschlager R. Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol 75: 12047-57, 2005.*

Fried M. W., Shiffman M. L., Reddy K. R., Smith C., Marinos G., Goncales F. L., Haussinger D., Diago M., Carosi G., Dhumeaux D., Craxi A., Lin A., Hoffman J. and Yu J. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med. 347: 975-982, 2002.*

Fried M. W., Hadziyannis S. J., Shiffman M., Messinger D. and Zeuzem S. Rapid virological response is a more important predictor of sustained virological response (SVR) than genotype in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol. 48: S, 2008.*

Gaudy C. and Goudeau A. La diversité du virus de l'hépatite C : méthodes d'étude, implication dans la pathogénèse et la résistance au traitement. *Virologie, 9: 343-55, 2005.*

Ge D, Fellay J, Thompson AJ, et al. Genetic variation in *IL28B* predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature 2009 ; 461 : 391-401.*

Ghany M, Nelson DR, Strades DB, Thomas DL, Seef LB. An up date on treatment of genotype 1 chronique hepatitis C virus infection : 2011 practice guideline by the american for study of liver diseases. *Hepatology 20011 ; 54 :1433-44.*

Halfon P, Trimoulet P, Bourlière M, Khiri H, de Ledinghen V, Couzigou P, et al, (2001). Hepatitis C virus genotyping based on 5'noncoding sequence analysis (Trugene). *J Clin Microbiol*, 39:1771-3.

Halfon P., Cartouzou G. and Bourlieire M. Les géotypes du Virus de l'hépatite C: Quels intérêts en pratique? *Hepato-Gastro 4* : 295, 1997.

Helle F, Cocquerel L. L'entrée du virus de l'hépatite C dans ses cellules cibles. *Virologie* 2008, 12 (2) : 105-16.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R, (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 11:1026-30.

Hoofnagle J. H., Lombardero M., Wei Y., Everhart J., Wiesner R., Zetterman R., Yun A. J., Yang L and Kim J. P. The treatment of chronic viral hepatitis. *N. Engl. J. Med.* 336: 347-356, 1997.

Hugle, T., Fehrmann, F., Bieck, E., Kohara, M., Krausslich, H.G., Rice, C.M., Blum, H.E., and Moradpour, D.(2001). The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein.

International Committee on Taxonomy of Viruses., C. Fauquet, and International Union of Microbiological Societies. Virology Division. 2005. Virus taxonomy : classification and nomenclature of viruses : eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier/Academic Press, Amsterdam ; Boston.

Ito, T., and Lai, M.M. (1997). Determination of the secondary structure of and cellular protein binding to the 3'-

Ivashkina, N., Wolk, B., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H.E., Penin, F., and Moradpour, D. (2002).The hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase membrane insertion sequence is a transmembrane segment. *Journal of virology* 76, 13088-13093.

Jensen D. M., Morgan T. R., Marcellin P., Pockros P. J., Reddy K. R., Hadziyannis S. J., Ferenci P., Ackrill A. M and Willems B. Early identification of HCV genotype 1 patients responding to 24 weeks peg interferon alpha-2a (40 kd)/ ribavirin therapy. *Hepatology* 43: 954-60, 2006.

Jones C. T., Murray C. L., Eastman D. K., Tassello J and Rice C. M. Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J Virol* 81:8374-8383, 2007.

Kaito M, Watanabe S, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Kobayashi Y, Konishi M, Yokoi M, Ishida S, Suzuki S, Kohara M, 1994. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol* 75(pt 7) :1755-1760.

Kaito M., Watanabe S., Tsukiyama-Kohara K., Yamaguchi K., Kobayashi Y., Konishi M., Yokoi M., Ishida S., Suzuki S. and Kohara M. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J. Gen. Virol.* 75: 1755-1760, 1994.

Kolykhalov A. A, Feinstone S. M, Rice C. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* 70:3363-3371, 1996.

Lauer G. M. and Walker B. D. Hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* 345: 41-52. 2001.

Lauer G-M, Walker B-D. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001; 345: 41-52.

Legrand-Abravanel F, Izopet J. Recombinaison génétique et virus de l'hépatite C. *Virologie* 2008; 12 (1) : 7-14.

Lindenbach, B.D., Pragai, B.M., Montserret, R., Beran, R.K., Pyle, A.M., Penin, F., and Rice, C.M. (2007). The C terminus of hepatitis C virus NS4A encodes an electrostatic switch that regulates NS5A hyperphosphorylation

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

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

Marcellin P., Bonjour M., Boujenah J. L., Couzigou P and Degodet A. Hépatite C ; Dépistage, clinique, prise en charge et conseils aux patients. 48 : 312-332, 2007.

Markus H. and Heim. Interferons and hepatitis C virus. *Swiss Med. Wkly.* 142: w13586, 2012.

Martell M, Esteban JL, Quer J, Genesca J, Weiner A, Esteban R, et al, (1992). Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasi-species nature of HCV genome distribution. *J Virol*, 66 : 3225-6.

McLauchlan J., Lemberg M. K., Hope G. and Martoglio B. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J* 21(15): 3980-8, 2002.

Miller R. H and Purcell R. H. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U S A)*, **87**: 2057-2061, **1990**.

Miyanari Y., Atsuzawa K., Usuda N., Watashi K., Hishiki T., Zayas M., Bartenschlager R., Wakita T., Hijikata M. and Shimotohno K. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat. Cell. Biol.* **9**: 1089-1097, **2007**.

Moradpour, D., Brass, V., Bieck, E., Friebe, P., Gosert, R., Blum, H.E., Bartenschlager, R., Penin, F., and Lohmann, V. (2004a). Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C

Moucari R, Asselah T, Cazals-Hatem D, Voitot H, Boyer N, Ripault MP, et al. Insulin resistance in chronic hepatitis C: association with genotypes 1 and 4, serum HCVRNA level, and liver fibrosis. *Gastroenterology*. 2008;134(2):416-23.

Nakayama E, Akiba T, Marumo F, Sato C. Prognosis of anti-hepatitis C virus antibody-positive patients on regular hemodialysis therapy. *J Am Soc Nephrol* 2000, 11 : 1896-1902.

Nicot T., Rogez S. and Denis F. Epidemiologie de l'hepatite C en Afrique. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **21**: 596-606, **1997**.

nonstructural protein 5A. *The Journal of biological chemistry* 277, 8130-8139.
of virology 78, 1352-1366.

Okuda K, Hayashi H, Yokozeki K, Irie Y. Destruction of hepatitis C virus particles by haemodialysis. *Lancet* 1996 ; 347 : 909-10.

Organisation mondiale de la santé, Journée mondiale contre l'hépatite 28 juillet. Plus proche qu'on ne croit. *Portuguese, 2012*

Ouzan D. Comment obtenir une efficacité maximale du traitement actuel de l'hépatite chronique virale C ? *Gastroenterol. Clin. Biol.* **31**: 573-577, **2007**.

Paul D, Dominique R, (2003). Virus de l'hépatite C. Elsevier (Ed). Paris, 190 p.

Paul D, Dominique R. Virus de l'hépatite C. Elsevier (Ed). Paris, 2003; P190.

Pawlotsky J. M. Prise en charge des malades atteints d'hépatite C Place des tests virologiques. *Gastroentérologie clinique & biologique*, **26**: 180-187, **2002**.

Penin F., Brass V., Appel N., Ramboarina S., Montserret R., Ficheux D., Blum H. E., Bartenschlager R. and Moradpour D. Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol. Chem.* **279**(39): 40835-43, **2004**.

Rampino T, Arbustini E, Gregorini M, Guallini P, Libetta C, Maggio M, Ranzano A, Silini E, Soccio G, Dal Canton A. Hemodialysis prevents liver disease caused by hepatitis C virus: Role of hepatocyte growth factor. *Kidney Int* 1999; 56: 2286-91.

Robertson B, et al. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. *International Committee on Virus Taxonomy. Arch Virol* 1998; 143: 2493-503.

Shimizu, Y. K., S. M. Feinstone, M. Kohara, R. Purcell and H. Yoshikura. Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. *Hepatology*. 23: 205-209, 1996.

Simmonds P, Alberti A, Alter H-J, Bonino F, Bradley D-W, et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 1994; 19: 1321-4.

Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deleage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspe, G., Kuiken, C., Maertens, G., et al. (2005). Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* (Baltimore, Md 42, 962-973).

Tai C. L., Chi W. K., Chen D. S. and Hwang L. H. The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *J Virol*. 70:8477-8484, 1996.

Takada N., Takase S., Takada A. and Date T. HCV genotypes in different countries. *Lancet*, 339: 808, 1992.

Takamizawa A., Mori C., Fuke I., Manabe S., Murakami S., Fujita J., Onishi E., Andoh T., Yoshida I. and Okayama H. J. Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J. Virol*. 65(3):1105, 1991.

Tan, S.L., Pause, A., Shi, Y., and Sonenberg, N. (2002). Hepatitis C therapeutics: current status and emerging strategies. *Nat Rev Drug Discov* 1, 867-881.

the endoplasmic reticulum. *Journal of virology* 77, 1578-1583.

Thomas DL, (2000). Hepatitis C epidemiology. 242 : 25-41.

untranslated region of the hepatitis C virus RNA genome. *Journal of virology* 71, 8698-8706.

Valtuille R, Fernandez JL, Berridi J, Moretto H, del Pino N, Rendo P, Lef L. Evidence of hepatitis C virus passage across dialysis membrane. *Nephron* 1998; 80 : 194-6.

VIII^{ème} entretiens médico-chirurgicaux du CHU de Tlemcen. Hépatopathies virales chroniques et transplantation hépatique. La faculté de médecine de Tlemcen, 12 février 2009.

Virology 284, 70-81.

Xu, Z., Choi, J., Lu, W., and Ou, J.H. (2003). Hepatitis C virus f protein is a short-lived protein associated with


You, S., Stump, D.D., Branch, A.D., and Rice, C.M. (2004). A cis-acting replication element in the sequence encoding the NS5B RNA-dependent RNA polymerase is required for hepatitis C virus RNA replication. *Journal*

Zeuzem S, Pawlotsky JM, Lukasiewicz E, et al. International, multicenter, randomized, controlled study comparing dynamically individualized versus standard treatment in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2005;43: 250-7.

Zignego, A.L., Ferri, C., Pileri, S.A., Caini, P., and Bianchi, F.B. (2007). Extrahepatic manifestations of Hepatitis C Virus infection: a general overview and guidelines for a clinical approach. *Dig Liver Dis* 39, 2-17.

Annexes

Annexe 1. Fiche de renseignement des malades atteints de l'hépatites virales B et C.

	INSTITUT PASTEUR D'ALGERIE Annexe de Sidi Fredj	Service de virologie humaine Laboratoire des hépatites virales Tél : 021 37 68 50 Fax : 021 37 76 47																																
FICHE DE RENSEIGNEMENTS DES HEPATITES VIRALES B & C																																		
Identification du patient Nom & Prénoms : _____ Nom de jeune fille : _____ Date de naissance : _____ Etat civil : marié(e) <input type="checkbox"/> célibataire <input type="checkbox"/> Tél : _____	Date : __ _ _ _	Identification du service demandeur Nom du médecin: _____ Service : _____ Structure : _____ Tél / Fax: _____ E-mail : _____																																
Analyses demandées : Renseignements cliniques :																																		
<ul style="list-style-type: none"> • Date de début de la maladie : __ _ _ _ • Signes cliniques : _____ • Diagnostic clinique suspecté : _____ 	- Date du dernier bilan hépatique : __ _ _ _ Normal <input type="checkbox"/> Perturbé <input type="checkbox"/> Valeurs des transaminases : _____																																	
Renseignements épidémiologiques : Hépatite virale C : préciser la période précédant les symptômes de 2 semaines à 6 mois : Hépatite virale B : préciser la période précédant les symptômes de 6 semaines à 6 mois : Est-ce que le patient a été :																																		
<ul style="list-style-type: none"> • En contact avec une personne présentant une HV aiguë ou chronique (suspectée ou confirmée) ? Si oui, quel type de contact ? : Sexuel : <input type="checkbox"/> Familial : <input type="checkbox"/> Autres : <input type="checkbox"/> 																																		
<ul style="list-style-type: none"> • Hémodialysé ? Si oui, préciser la date de la 1ere dialyse : __ _ _ _ • Transfusé ? Si oui, préciser la date de la transfusion : __ _ _ _ • Traité pour une infection sexuellement transmissible ? Si oui, préciser la date du dernier traitement : __ _ _ _ • Reçu des soins dentaires ou ORL ou fait des examens invasifs ? Si oui, préciser la date : __ _ _ _ • Hospitalisé ? Si oui, préciser la date : __ _ _ _ • Toxicomane IV ou pernasale ? 	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 30%;"></th> <th style="width: 15%; text-align: center;">oui</th> <th style="width: 15%; text-align: center;">non</th> <th style="width: 15%; text-align: center;">indeterminé</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> </tbody> </table>			oui	non	indeterminé	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	oui	non	indeterminé																															
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																															
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																															
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																															
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																															
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																															
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																															
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																															
Le patient travaille-t-il dans une structure :																																		
<ul style="list-style-type: none"> • médicale l'exposant directement au sang humain ? public ou de secours (pompier, secouriste, etc) ? Si oui, combien de fois a-t-il été exposé ? __ _ 	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tbody> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> </tbody> </table>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																										
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																
Le patient a-t-il fait un : - Scarification : <input type="checkbox"/> Piercing <input type="checkbox"/> Tatouage. <input type="checkbox"/>																																		



FICHE DE RENSEIGNEMENTS DES HEPATITES VIRALES B & C

Le patient est-il vacciné contre l'hépatite B ?

Si oui, la date de la vaccination : 1^{ère} dose : |_|_|_|_| 2^{ème} dose : |_|_|_|_| 3^{ème} dose : |_|_|_|_|

La femme enceinte : a-t-elle été confirmée AgHBs positif pendant la grossesse ?

Si oui, préciser la date de la confirmation de l'AgHBs : |_|_|_|_|

Le nouveau né : a-t-il été vacciné ?

Si oui, la date de la vaccination : 1^{ère} dose : |_|_|_|_| 2^{ème} dose : |_|_|_|_| 3^{ème} dose : |_|_|_|_|

A-t-il reçu des immunoglobulines spécifiques (HBIG) ?

Si oui, préciser la date : |_|_|_|_|

NB : Si des analyses similaires ont déjà été effectuées à l'IPA, rappeler obligatoirement leurs numéros d'ordre ou bien les joindre à la fiche de renseignements.

Tout prélèvement doit obligatoirement être accompagné d'une fiche de renseignements correctement remplie, d'un bon de paiement ou d'une prise en charge du service demandeur.

Annexe 2. Test de mise en évidence des anticorps anti-VHC

A-2.1 AxSYM® HCV version 3.0 (Abbott – Diagnostics).



Réactifs ; AxSYM® HCV version 3.0 Reagent Pack

Coffret-réactifs, 100 tests

- ❖ 1 flacon (9.9 ml) de microparticules recouvertes d'antigènes VHC dans du tampon MES contenant des stabilisants de protéines. Concentration minimale : 0.01% de particules solides. Conservateur : azide de sodium. (flacon réactif 1)
- ❖ 1 flacon (12.1 ml) de conjugué d'anticorps de chèvre anti-IgG humaines : phosphatase alcaline dans du tampon TRIS contenant des stabilisants de protéines. Concentration minimale : 0.01ug/ml. Conservateur : azide de sodium. (flacon réactif 2)
- ❖ 1 flacon (28.0 ml) de diluant pour échantillons 2 contenant du tampon TRIS avec des protéines, des détergents et des lysats. Conservateurs : agents antimicrobiens. (flacon réactif 3)
- ❖ 1 flacon (50.2 ml) de diluant pour échantillons 1 contenant 0.3 mol/l de chlorure de sodium dans du tampon TRIS. Conservateurs : azide de sodium et agents antimicrobiens. (flacon réactif 4)
- ❖ 1 flacon (2.0 ml) d'Axsym HCV version 3.0 Index calibrator. Plasma humain recalcifié inactivé, réactif pour les anticorps anti-VHC. Conservateur : azide de sodium. Colorant : vert [Tartrazine (acide yellow No.23) et Erioglaucine (acid blue No.9)].

Contrôles

Axsym HCV version 3.0 controls

- ❖ 2 flacons (7.0 ml chacun) d'Axsym HCV version 3.0 controls préparés avec du plasma humain recalcifié. Conservateur : azide de sodium.
- CONTROL (-) le contrôle négatif.

- CONTROL (+) le contrôle positif contient du plasma humain recalcifié inactivé, réactif pour les anticorps anti-VHC.

Autres réactifs

- ❖ 2 flacons (220 chacun) d'Axsym Probe Cleaning Solution contenant de l'hydroxyde d'ammonium tétraéthylque (TEAH) à 2%. (solution 1)
- ❖ 4 flacons (230ml chacun) de solution 1 (MUP) contenant du phosphate de méthyl-4-ombelliféryl à 1.2 mol/l dans du tampon AMP. Conservateur : azide de sodium. (Solution 2)
- ❖ 4 flacons (1000 ml chacun) de solution 3 (solution de lavage pour matrices) contenant 0.3 mol/l de chlorure de sodium dans du tampon TRIS. Conservateurs : azide de sodium et agents antimicrobiens. (Solution 3)
- ❖ 1 bidon (10l) de solution 4 (diluant) contenant du tampon à 0.1 mol/l. conservateurs : azide de sodium et agents antimicrobiens. (Solution 4)

Procédures de dosage

Le statut de l'appareil doit indiquer CHAUFFAGE, PAUSE, PRET ou STOP avant d'ajouter ou d'enlever des segments-échantillons, des coffrets-réactifs ou des cartouches de réaction.

1. Vérifier que les matrices et les solutions communes sont en qualité suffisante à bord de l'appareil et que des segments-échantillons sont disponibles.
2. Vérifier que la capacité des poubelles est suffisante.
3. Programmer le HCV version 3.0 Index Calibrator, controls et/ou les échantillons de patients.

Calibration indice :

Effectuer la calibration Axsym HCV version 3.0 en analysant 2 répliques du calibrateur indice. Distribuer au moins 4 gouttes de calibrateur indice dans un godet-échantillon.

Contrôle :

Effectuer le contrôle de qualité en analysant les contrôles positifs et négatif (un test pour chacun). Distribuer 4 gouttes de chacun des contrôles positifs et négatifs dans un godet-échantillon différent pour chaque contrôle.

Echantillon de patients

S'assurer que le volume suffisant est présent dans les tubes. Le volume minimum d'échantillon nécessaire est de **150 µl** sauf si le dosage est **urgent (83 µl)**.

4. Placer les segments-échantillons contenant les échantillons demandés dans le carrousel-échantillons.
5. Ouvrir le flacon réactif 4 contenant le diluant pour échantillon1. Placer le coffret-réactifs HCV version 3.0 dans le carrousel pour coffrets-réactifs.
6. S'assurer que des cartouches de réaction (CR) sont présentes sur le carrousel pour cartouches de réaction. Des CR supplémentaires peuvent être rajoutées à tout moment, si nécessaire.
7. Appuyer sur touche LANCER. Toutes les saisies de l'écran « Liste des demandes » sont transférées à l'écran « Statut des demandes » pour le traitement des échantillons.
8. Vérifier les résultats afin de déterminer si une réanalyse est nécessaire.
9. Fermer le flacon réactif 4 et enlever les échantillons et l'Axsym HCV version 3.0 reagent Pack de l'unité d'échantillonnage lorsque l'analyse est terminée. Conserver entre 2 et 8 °C.

A-2.2 Monolisa™ anti-HCV PLUS version 2

Composition du coffret Monolisa™ anti-HCV PLUS version 2

Solution	Type de reagents	Présentation	
		1 plaque	5 plaques
R1	Microplaque 12 barrettes de 8 puits chacune, coatés avec 3 protéines recombinantes spécifiques (antigènes spécifiques au virus HCV).	1	5
R2	Solution de lavage (x20) ; Tampon Tris-NaCl pH7, 4 Conservateur : ProClin™ 300(0.04%).	1 flacon (70ml)	1 flacon (235ml)
R3	Controle negatif : Sérum humain négatif pour AC anti-VHC, Ag HBs et AC anti-HIV1, AC anti-HIV2. Conservateurs : azide de sodium (< 0.1%).	1 flacon (1 ml)	1 flacon (3 ml)
R4	Controle positif : Sérum humain contenant des anticorps anti-VHC, négatif pour Ag HBs et AC anti-HIV1, AC anti-HIV2, inactivé photochimiquement. Conservateur : azide de sodium (< 0.1%).	1 flacon (1 ml)	1 flacon (3ml)
R6	Solution de dilution :	1 flacon (15 ml)	1 flacon (2x40ml)
R7	Conjugué : anticorps monoclonaux anti-IgG humaines couplés à la peroxydase. Conservateur : Thimerosal (< 0.01%).	1 flacon (15ml)	1 flacon (2x40m)
R8	Substrat : acide citrique et la solution d'acétate de sodium à pH 4,0.	1 flacon (60ml)	1 flacon (2x60ml)
R9	Chromogène : solution contenant tetramethyl benzidine (TMB).	1 flacon (5ml)	1 flacon (2x5ml)
R10	Solution stop: Acide sulfurique 1N	1 flacon (28ml)	1 flacon (3x28ml)

Reconstitution des Réactifs – Validité – Conservation

Avant d'utiliser le kit de Monolisa™ anti-HCV PLUS version 2 reagents, laisser les reprendre la température de la chambre pour 30 minutes.

La solution de lavage dilué (R2)

- La solution de lavage dilué doit être préparée juste avant utilisation.
- Diluer 1 volume de R2 dans 19 volumes d'eau distillée (Besoin de 800 ml pour une plaque qui contient 12 barrettes)

Solution enzymatique (R9+R8)

- La solution enzymatique doit être préparée juste avant utilisation.
- Diluer 1 volume de R9 dans 10 volumes de R8 (exemple 1ml de R9 dans 10ml de R8).

Solution de conjugué (R7)

La solution de conjugué de travail doit être mélangé avant utilisation.

Solution de dilution (R6)

La solution de dilution doit être mélangée avant utilisation.

Tous les réactifs, conservés à +2 - 8°C, sont stables après ouverture jusqu'à la date de péremption indiquée sur les étiquettes respectives.

Mode opératoire

- Suivre strictement le protocole proposé.
- Inclure le contrôle négatif et le contrôle positif fournis dans la trousse pour l'ensemble des tests effectués.
- Appliquer les bonnes pratiques du laboratoire :

1. Définir strictement le plan d'identification et une distribution simple des solutions de travail.
2. Préparer la solution de lavage dilué.
3. Préparer la microplaque.
4. Ajouter directement et successivement dans la microplaque :
 - 4.1) 80ul de diluant (R6) dans chaque puits.
 - 4.2) 20ul de contrôle négatif (R3) dans les puits A1, B1.
20ul de contrôle positif (R4) dans les puits C1, D1, E1.
20ul du 1er sérum du patient dans le puits F1
20ul du 2eme sérum dans le puits G1, etc.....

Remarque ; après l'ajout des sérums des patients dans les puits de la microplaque, il apparaîtra un couleur bleue.

5. Recouvrir la plaque avec le couvre-plaque fourni.
6. Incuber la microplaque dans un incubateur pendant :
Procédure 1: 60 +/- 5 minutes a 37 C +/-1C.
Procédure 2: 60 +/- 5 minutes a 40 C +/-1C.
7. Retirer le couvre-plaque avec précaution de façon à éviter d'éclabousser ou de mélanger les échantillons. Incliner la microplaque pour aspirer le mélange des puits. Laver la microplaque avec de la solution de lavage (0.370 ml). Répéter les étapes de lavage au minimum trois fois.
Le volume résiduel doit être baissé moins de 10ul en tournant la microplaque sur un papier absorbant.
8. Distribuer 100ul de solution de conjugué dans chaque puits. Le conjugué doit être mélangé délicatement avant utilisation. Couvrir la microplaque avec un couvre-plaque et incuber :
Procédure 1: 30 +/- 5 minutes a 37 C +/- 1C.
Procédure 2: 30 +/- 5 minutes a 40 C +/- 1C.

Remarque : après avoir ajouté le conjugué dans chaque puits, la couleur devient verte.

9. Retirer le couvre-plaque, aspirer le mélange des puits et laver 4 fois, tourner la microplaque sur un papier absorbant.
10. Préparer la solution enzymatique (R9+R8).
11. Ajouter dans chaque puits 100 ul la solution enzymatique préparée. Mettre la réaction dans une chambre sombre pour 30 +/- 5 minute avec température entre 18-30 °C.
Remarque : après avoir ajouté la solution enzymatique dans chaque puits, la couleur devient rose.
12. Ajouter 100 ul de solution stop (R10)

Remarque : la solution stop n'a aucune couleur. Après avoir ajouter la solution stop la couleur rose de substrat disparaîtra (pour l'échantillon négatif) ou elle se tournera de la couleur bleu à la couleur jaune (pour l'échantillon positif).

13. Essuyer le dessous de la microplaque. lire la densité optimale a 450/920-700 nm dans le spectrophotomètre, au moins 4 minutes après l'ajout de la solution stop et dans les 30 minutes d'arrêt de la réaction.

Calculer et interpréter des résultats

La présence ou l'absence de des anticorps anti HCV est déterminée par la comparaison pour chaque échantillon l'absorbance enregistrée avec les valeurs cut-off calculée.

- 1- Calculer les moyens de valeurs d'absorbance du contrôle positif.
Moyen OD R4= totale de densité optimal/3(C1, D1, E1)
- 2- Calculer la valeur cut-off (CO)
CO= Moyen OD R4/ 5

La validation

- a) Pour le contrôle négatif : chaque valeur d'absorbance mesurée pour chaque échantillon doit être inférieure à 0.150
- b) Pour le contrôle positif :
 - La moyenne de la valeur d'absorbance mesurée doit être supérieure ou égal à 1.000 et inférieure ou égal à 2.400.
 - Si l'un des valeurs de contrôle positif diffère par plus de 30% de la valeur moyenne, ignorer la valeur et porter sur les deux valeurs restant de contrôle positif.
 - Le test doit être répéter si le contrôle négatif et/ou si plus qu'un contrôle positif se trouve hors les limites montrés au-dessus.

Interprétation des résultats

- Une densité optimale d'un échantillon est inférieure a la valeur cut-off est considéré comme négatif (-).
- Une densité optimale d'un échantillon est supérieure ou égal à la valeur cut-off est considéré comme positif (+), elle doit être retester avant l'interprétation finale.
- Apres avoir retester l'échantillon, si la deuxième ou troisième mesure de la densité optimale indique positif (supérieure ou égal la valeur cut-off), l'échantillon est confirmé positif. L'échantillon est considéré négatif si les deux valeurs sont inférieures de la valeur cut-off.

Annexe 3. Test de quantification de la charge virale

A-3.1 COBAS® AmpliPrep /COABS® TaqMan® HCV TEST (Roche Diagnostics™)



Réactifs spécifiques au COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan Analyser

1. Kit des réactifs :
 - Réactifs de préparation des échantillons :
 - Cassette du réactif des billes (HCV CS1) : billes = MGP dans de l'isopropanol.
 - Cassette du réactif de lyse (HCV CS2) : guanidine thiocyanate.
 - Cassette des multi-réactifs (HCV CS3) : (8% protéase) + EB (tampon tris avec 0.2% methylparaben).
 - Cassette des tests spécifiques (HCV CS4) : contrôle interne QS + Mn2+ + MMx.
 - Réactifs de contrôle :

- Témoin négatif (CTM (-) C).
- Témoin hautement positifs (HCV H(+) C).
- Témoin faiblement positifs (HCV L(+) C).
- Pince à code-barres du témoin fortement positif.
- Pince à code barre du témoin faiblement positif.
- Pince à code barre du témoin négatif.

2. Matériel requis :

- Portoir à échantillons
- Portoir à réactifs
- Portoirs pour unités de traitement des échantillons
- Couvercle pour tubes 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'entrée (Tubes S) à pince à code barre.
- Portoir pour embouts K.
- Coffret de 12 x 96 tubes K.

Procédure de travail sur l'appareil COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan Analyser

A- Mise en marche des appareils

- Mettre la station de travail du logiciel AMPLILINK sous tension.
- Vérification et maintenance du COBAS® AmpliPrep et du COBAS® TaqMan 48.

B- Chargement des réactifs

- Déballer les réactifs et les charger immédiatement.
- Les insérer dans les portoirs.

C- Chargement des articles jetables (instruments du COBAS® AmpliPrep)

D- Chargement des échantillons

- Attacher les étiquettes à code barre
- Créer l'ordre des échantillons à l'aide du logiciel AMPLILINK.
- Préparer la liste de travail
- Vortexer/pipeter les échantillons et les témoins.
- Remplir et placer les S-tubes dans les portes échantillons.
- Charger le porte échantillon.

E- Démarrage de l'appareil COBAS® AmpliPrep à l'aide du logiciel AMPLILINK.

F- Fin de cycle de l'appareil COBAS® AmpliPrep et transfert des porteurs K à l'analyseur COBAS® TaqMan 48.

G- Démarrer l'analyseur COBAS TaqMan 48.

H- Une fois l'amplification finie, revoir et accepter les résultats à l'aide du logiciel AMPLILINK.

I- Retirer les déchets

- 1- Instrument COBAS® AmpliPrep : jeter les portes réactifs, les portes SPU usés et les portoirs pour embouts K vides.
- 2- Analyseur COBAS® TaqMan®48 : retirer le porteur K.

Fonctionnement de l'appareil COBAS®AmpliPrep :

- Pipetage du contrôle interne (QS) et de la protéase dans le compartiment SPU droit.
- Transport des S-tubes des portes échantillons au portes SPU.
- Pipetage du sérum dans le compartiment SPU droit et mixage avec le S-tip.
- Pipetage du tampon de lyse et le réactif MGP dans le compartiment SPU droit.
- Mélange et incubation à 37°C (2 mélanges sont effectués durant l'incubation).
- Transport des SPU dans la station de séparation.
- Séparation des particules magnétiques.
- Aspiration du mélange de lyse.
- Distribution de la solution de lavage dans les compartiments de réaction des SPU.
- Lavage par rotation de la roue magnétique, aspiration de la solution de lavage et déchargement dans le compartiment à déchets. L'opération est réalisée deux fois.
- Distribution de la solution d'élution dans les compartiments de réaction des SPU.
- Homogénéisation des MGPs et incubation 340 secondes.
- Transfert des SPU de l'incubateur d'extraction de la cible à la station de refroidissement et transport des K-tubes dans la station de séparation.
- Ouverture des K-tubes, pipetage des MnAc et MMx dans les K-tubes.
- Fermeture des K-tubes et transfert des SPU dans le porte SPU.

Principe de la quantification de l'ARN initial par PCR en temps réel:

- Bases mathématiques de la quantification :

Si N est le nombre de copies du gène au cycle Cn de la PCR et N0 le nombre de copies présentes au départ dans le tube, le nombre de copies du gène au cycle Cn peut être exprimé par la formule :

$$N = N0. (1 + E)^{Cn} \quad (1)$$

Où E est l'efficacité de la PCR (avec E = 1).

Le nombre de molécules accumulées au cycle-seuil Ct quel que soit N0 est donc :

$$N = N0. (1 + E)^{Ct} \quad (2)$$

Au cycle-seuil, l'intensité de la fluorescence est la même pour tous les tubes. Donc, au cycle seuil, le nombre de copies est identique quelle que soit la quantité initiale d'ARN du VHC. Ainsi, pour deux nombres de molécules initiaux différents, N1 et N2, on peut écrire :

$$N1 .(1 + E)^{Ct1} = N2 .(1 + E)^{Ct2}$$

Soit :

$$\frac{N1}{N2} = \frac{(1+E)^{Ct2}}{(1+E)^{Ct1}}$$

Ou encore :

$$\frac{N1}{N2} = (1 + E)^{(Ct2 - Ct1)} \quad (3)$$

La différence de cycle-seuil (Ct2 - Ct1) est donc fonction du rapport des nombres de molécules d'ARN initiaux respectifs, et, pour E = 1, si Ct2 - Ct1 = 1, alors N1/N2 = 2.

C'est-à-dire que s'il existe une différence d'un cycle entre les Ct de deux tubes (par exemple si Ct1 = 24, Ct2 = 25), on peut en déduire que le tube n°1 contenait au départ deux fois plus de copies d'ARN du VHC amplifié que le tube n°2. Ainsi, en comparant la valeur du cycle-seuil obtenu dans un échantillon aux valeurs de la gamme-étalon contenant des

quantités connues d'un standard, il est possible de déterminer le nombre de copies d'ARN du VHC présent initialement dans cet échantillon.

- Equation de la gamme étalon :

Pour mesurer précisément le nombre de copies initial d'un échantillon (N_0), il est plus facile d'utiliser une représentation linéaire reliant le C_t à N_0 .

Le nombre de molécules accumulées au cycle-seuil C_t est exprimé par l'équation (2) :

$$N = N_0 \cdot (1+E)^{C_t}$$

D'où on en déduit :

$$\text{Log } N = \text{log } N_0 + C_t \cdot \text{log } (1+E) \quad (4)$$

En exprimant le cycle-seuil (C_t) en fonction du logarithme de la quantité de matrice initiale ($\text{Log } N_0$), on obtient la droite d'équation suivante :

$$C_t = -\frac{1}{\text{log}(1+E)} \text{log } N_0 + \frac{\text{log } N}{\text{log}(1+E)} \quad (5)$$

A-3.2 Abbott RealTime™ HCV



m2000sp



m2000rt

Réactifs ; Abbott RealTime HCV Amplification Reagent Kit (Coffret-réactifs pour amplification)

1. INTERNAL CONTROL (Contrôle interne)

(4 flacons de 1,2 ml chacun)

< 0,01% d'ARN encapsulé non infectieux contenant des séquences de contrôle interne dans du plasma humain négatif. Le plasma humain négatif est non réactif pour (AGHBs, l'ADN VHB, l'ARN VHC, VIH, et les anticorps anti-VIH-1/VIH-2 et anti-VHC.

2. AMPLIFICATION REAGENT PACK (coffret-réactifs pour amplification)

(4 boîtes de 24 tests chacune)

- 1 flacon (0,141 ml) d'enzyme rTth polymérase thermostable.
- 1 flacon (1,10 ml) de réactif d'oligonucléotides de VHC.
- 1 flacon (0,40 ml) de tractif d'activation.

Abbott RealTime HCV Control kit (Contrôles)

1. Contrôle (-)

(8 flacons de 1,8 ml chacun). Le plasma humain négatif est non réactif pour (AGHBs, l'ADN VHB, l'ARN VHC, VIH, et les anticorps anti-VIH-1/VIH-2 et anti-VHC.

2. Control (L) (contrôle positif bas)

(8 flacons de 1,3 ml chacun). ARN encapsulé non infectieux contenant des séquences de VHC dans du plasma humain négatif. Le plasma humain négatif est non réactif pour (AGHBs, l'ADN VHB, l'ARN VHC, VIH, et les anticorps anti-VIH-1/VIH-2 et anti-VHC.

3. Control (H) (contrôle positif haut)

(8 flacons de 1,3 ml chacun). ARN encapsulé non infectieux contenant des séquences de VHC dans du plasma humain négatif. Le plasma humain négatif est non réactif pour (AGHBs, l'ADN VHB, l'ARN VHC, VIH, et les anticorps anti-VIH-1/VIH-2 et anti-VHC.

Abbott RealTime HCV Calibrator kit (Calibrateurs)

1. CALIBRATOR A

(12 flacon de 1,3 ml chacun). ARN encapsulé non infectieux contenant des séquences de VHC dans du plasma humain négatif. Le plasma humain négatif est non réactif pour (AgHBs, l'ADN VHB, l'ARN VHC, VIH, et les anticorps anti-VIH-1/VIH-2 et anti-VHC.

2. CALIBRATOR B

(12 flacon de 1,3 ml chacun). ARN encapsulé non infectieux contenant des séquences de VHC dans du plasma humain négatif. Le plasma humain négatif est non réactif pour (AgHBs, l'ADN VHB, l'ARN VHC, VIH, et les anticorps anti-VIH-1/VIH-2 et anti-VHC.

Remarque : les coffret—réactifs pour amplification et contrôle et calibrateurs doivent être conservés à une température inférieure ou égale à (-10 °C) lorsqu'ils ne sont pas utilisés.

Prélèvement et conservation des échantillons

Le dosage Abbott RealTime HCV peut être effectué sur des échantillons de sérum et de plasma (prélevé sur EDTA et ACD-A) humains. Suivre les instructions du fabricant pour le traitement des tubes de prélèvement.

Les échantillons fraîchement prélevés (sang total) peuvent être conservés entre 2 et 30 °C jusqu'à 6 heures avant la centrifugation.

Après centrifugation, séparer le sérum ou le plasma des cellules. Les échantillons de sérum ou de plasma peuvent être conservés :

1. jusqu'à 24 heures entre 15 et 30°C
2. jusqu'aux 3 jours entre 2 et 8 °C
3. pour une durée à une prolongée à une température ou égale à -70 °C.

Eviter les cycles congélation /décongélation répétés. Si les échantillons sont congelés, les amener à une température comprise entre 15 et 30°C. Une fois décongelés, les échantillons peuvent être conservés jusqu'à 6 heures entre 2 et 8°C s'ils ne sont pas traités immédiatement.

Protocole de dosage : appareils Abbott m2000sp et vm20000rt.

Le personnel du laboratoire doit être formé à l'utilisation des appareils Abbott m2000sp et vm20000rt. L'utilisateur est censé disposer d'une connaissance approfondie des applications utilisées sur les appareils et doit suivre les bonnes pratiques de laboratoire.

1. Décongeler les contrôles du dosage, les contrôles internes et les réactifs d'amplification entre 15 et 30 °C ou entre 2 et 8 °C. ne décongeler les calibreurs entre 15 et 30 °C ou entre 2 et 8 °C qu'en vue d'une calibration. Une fois décongelés, les contrôles de dosage, les contrôles internes et les calibreurs peuvent être conservés entre 2 et 8 °C jusqu'à 24 heures avant leur utilisation. Passer chaque calibreur et chaque contrôle au vortex pendant 2 à 3 secondes et répéter l'opération 3 fois avant de les utiliser. Vérifier que le liquide se trouve au fond du flacon après l'avoir passé au vortex. Si ce n'est pas le cas, tapoter le flacon sur la paillasse pour en faire descendre le contenu.
2. Retourner doucement les flacons de préparation des échantillons Abbott m Sample préparation System pour garantir une solution homogène. Si des cristaux sont détectés dans l'un des flacons récemment ouverts, laisser le réactif atteindre la température ambiante jusqu'à disparition des cristaux. Ne pas utiliser les réactifs tant que les cristaux ne sont pas dissous.
3. Avant utilisation, passer chaque contrôle interne au vortex pendant 2 à 3 secondes et répéter l'opération 3 fois.
4. Utiliser une **PIPETTE DESTINEE UNIQUEMENT AU CONTROLE INTERNE** calibrée avec précision pour ajouter 500 µl de contrôle interne à chaque flacon de tampon mLysis. Homogénéiser le flacon en le retournant délicatement 5 à 10 fois pour minimiser la formation de mousse.
5. **Un maximum de 48 échantillons peut être traité par analyse.** Un contrôle négatif, un contrôle positif bas et un contrôle positif haut sont requis pour une analyse, permettant ainsi à 45 échantillons au maximum d'être traités.
 - Le volume minimum d'échantillon pour le dosage Abbott RealTime HCV et les exigences relatives aux portoirs associés sur le m200sp sont les suivants :

**Volume minimum d'échantillon
Pour le dosage
Abbott RealTime HCV**

Portoir	diamètre du tube*	Volume minimum d'échantillon	
		0.2 ml	0.5 ml
13 mm	11.6 mm à 14.0 mm	0.7 ml	1.0 ml
16 mm	15.0 mm à 16.0 mm	1.0 ml	1.3 ml

*Se rapporte au diamètre extérieur du tube échantillon

- S'ils sont congelés, décongeler les échantillons à une température comprise entre 15 et 30 °C ou entre 2 et 8 °C. Une fois décongelés. Les échantillons peuvent être conservés entre 2 et 8 °C jusqu'à 6 heures, s'ils ne sont pas traités immédiatement.
- Passer chaque échantillon au Vortex pendant 2 à 3 secondes et répéter l'opération 3 fois avant de les charger le plan de travail du m200sp. **les échantillon présentant un aspect ou une turbidité inhabituels doivent être clarifiés par centrifugation à 2000g pendant 5 minutes préalablement à leur analyse.** Fractionner chaque échantillon en aliquots dans des tubes ou flacons propres, si nécessaire. Se reporter au Manuel Technique du m200sp pour obtenir les spécifications relatives à la taille des tubes. Eviter de toucher l'intérieur du bouchon en ouvrant les tubes.

6. Placer les contrôles positifs bas et haut, le contrôle négatif, les calibrateurs (le cas échéant) et les échantillons patients sur le portoir échantillons du m2000sp.
7. Placer les cupules réactionnelles de 5 ml sur le portoir de l'unité de traitement 1 ml du m200SP
8. Charger les réactifs Abbott m Sample préparation System (Système de préparation m des échantillons) et la plaque à 96 puits profonds sur le plan de travail du m2000sp comme le décrit le chapitre "Mode opératoire" du Manuel Technique Abbott m2000sp.
9. Dans l'écran Protocol (Protocole), sélectionner le fichier d'application approprié correspondant au volume d'échantillon testé. Initialiser le Protocole d'extraction des échantillons comme décrit dans le Manuel Technique du m2000sp, Chapitre "Mode opératoire"
 - Saisir les valeurs spécifique des lots de calibrateurs (requis si aucune courbe de calibration n'est enregistrée sur le m2000rt) et des contrôle dans les champs **sample Extraction : worktable Setup (Extraction des échantillons : Configuration du plan de travail), Calibrator (calibrateur) et control (contrôle)**. les valeurs spécifique des lots sont indiquées sur chaque carte de kit de calibrateurs et de contrôle Abbott RealTime HCV.
 - Le Protocole d'addition du master mix Abbott m2000sp (étape 12) doit être lancé dans l'heure suivant la préparation des échantillons.

Remarque : changer de gants avant de manipuler les réactifs d'amplification.

10. Charger les réactifs d'amplification et de flacon de master mix sur le plan de travail du m200sp, une fois la préparation des échantillons terminés.
 - Chaque coffret-réactifs pour l'amplification permet de traiter jusqu'à 24 réactions.
 - Avant d'ouvrir les réactifs d'amplification, vérifier que le liquide se trouve au fond du flacon. si ce n'est le cas, tapoter le flacon tenu à la vertical sur la paillasse pour en faire descendre le contenu.
 - Retirer et jeter les bouchons des flacons de réactifs d'amplification.
 - Un deuxième coffret-réactifs pour l'amplification et requis pour l'exécution de 25 à 48 réactions.
11. Dans l'écran Protocole, sélectionner le fichier d'application approprié correspondant au volume d'échantillon testé. Initialiser le protocole d'addition du master mix Abbott m2000sp.
 - Le protocole m2000rt (étape 16) doit être lancé dans les 40 minutes suivantes, l'initialisation de protocole d'addition du master mix (étape 12).
12. Allumer et initialiser l'appareil Abbott m200rt dans la zone d'amplification.

Remarques :

- l'appareil Abbott m200rt requiert 15 minutes de temps de préchauffage.
- Retirer les gants avant de retourner dans la zone de préparation des échantillons.

13. Sceller la plaque de réaction optique à 96 puits Abbott lorsque le m200sp a terminé de mélanger les échantillons et master mix.
14. Placer la plaque de réaction optique scellée dans la base du support anti-éclaboussures pour la transférer sur l'appareil Abbott m2000rt.
15. Placer la plaque de réaction optique à 96 puits Abbott sur le m2000rt. Dans l'écran protocole sélectionner les fichiers d'application appropriée correspondant au volume d'échantillon testé. Lancer le protocole Abbott RealTime HCV, comme le décrit le chapitre Mode opératoire du Manuel Technique Abbott m2000rt.

Annexe 4. Test de génotypage

A-5.1 LINEAR ARRAY Hepatitis C Virus Génotyping test

Réactifs Linear array

Composant	Description	Quantité
Bandelettes	Bandelette en nylon enduite de 9 sondes ADN de génotypes spécifiques du HCV, 12 bandelettes dans une pochette refermable avec dessiccatif.	4*12 tests
LINEAR ARRAY detection Kit, version 2.0	<p>Nécessaire de détection par LINEAR ARRAY.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Solution de denaturation (DN) • Concentrer de SDS • Concentrer de SSPE • Conjugué streptavidine-peroxydase de raifort (SA-HRP) • Concentré de citrate (CIT) • Substrat A (SUB A) • Substrat B (SUB B) • 24-well Tray with Lid ; Plateau de 24 puits avec bouchon 	<p>96 tests</p> <p>2*12 ml 4*27 ml 2*160 ml 2*2 ml 2*36 ml 3*160 ml 3*40 ml 1 chacun</p>
AMPLICOR® HCV Specimen preparation Kit, version 2.0	<p>Nécessaire de préparation des échantillons AMPLICOR® HCV, version 2.0</p> <ul style="list-style-type: none"> • Réactif de lyse du HCV VERSION 2.0 (HCV LYS) • Diluant d'échantillon du HCV (HCV DIL) • Standard interne du HCV (HCV IC) 	<p>96 tests</p> <p>8*6.9 ml 8*4.8 ml 8*0.1 ml</p>
AMPLICOR® HCV Controls Kit, version 2.0	<p>Nécessaire de témoins AMPLICOR®HCV, version 2.0</p> <ul style="list-style-type: none"> • Plasma négatif (d'origine humaine) (NHP) non réactif aux tests pour les anticorps anti-HCV, les anticorps anti-HIV1/2, l'antigène p24 du HIV et l'antigène AgHBs. • Témoin (-) du HCV, version 2.0 (HCV (-) C, v2.0) • Témoin (+) du HCV, version 2.0 (HCV (+) C, v2.0) 	<p>8 sets</p> <p>8*0.6 ml 8*0.1 ml 8*0.1 ml</p>
AMPLICOR® HCV Amplification Kit, version 2.0	<p>Nécessaire d'amplification AMPLICOR® HCV, version 2.0</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mélange réactionnel du HCV, version 2.0 (HCV MMX, v2.0) • Solution de manganèse du HCV, version 2.0 (HCV Mn 2+, v2.0) 	<p>96 tests</p> <p>8*0.7 ml 8*0.1 ml</p>

AMPLICOR® HCV Detection Kit, version 2.0	Nécessaire de détection AMPLICOR® HCV, version 2.0 <ul style="list-style-type: none"> • Microplaque HCV, version 2.0 (HCV MWP, v2.0) • Solution de dénaturation (DN) • Tampon d'hybridation du HCV (HCV HYB) • Conjugué avidine-peroxydase de raifort (AV-HRP) • Substrat A (SUB A) • Substrat B (SUB B) • Réaction d'arrêt (STOP) • Concentré de lavage 10X (10X WB) 	96 tests 1*96 tests 1*12 ml 1*20 ml 1*12 ml 1*12 ml 1*3 ml 1*12 ml 2*90 ml
	Nécessaire AMPLICOR® de détection de témoins internes <ul style="list-style-type: none"> • Microplaque de témoin interne (IC MWP) • Conjugué avidine-peroxydase de raifort (AV-HRP) • Substrat A (SUB A) • Substrat B (SUB B) • Réaction d'arrêt (STOP) • Concentré de lavage 10X (10X WB) 	96 tests 1*96 tests 1*12 ml 1*12 ml 1*3 ml 1*12 ml 2*90 ml
AMPLICOR® Internal Control Detection Kit	Nécessaire de détection COBAS® AMPLICOR® HCV, version 2.0 <ul style="list-style-type: none"> • Suspension n°1 de la sonde HCV, version 2.0 (CX PS1, v2.0). particule paramagnétiques enduites d'une sonde de capture oligonucléotidique spécifique au HCV. • Suspension n°2 de la sonde HCV, version 2.0 (CX4, v2.0) 	100 tests 1*100 tests 1*100 tests
COBAS® AMPLICOR® Control Detection Kit, version 2.0	Nécessaire de réactifs de détection COBAS® AMPLICOR® <ul style="list-style-type: none"> • Solution de dénaturation (DN4) • Conjugué avidine-peroxydase de raifort (CN4). Albumine bovine d'origine mammifère 	100 tests 1*100 tests 1*100 tests
	<ul style="list-style-type: none"> • Substrat A (SUB 3) • Substrat B (SB) 	5*75 tests 5*5 ml

COBAS® AMPLICOR® Conjugate Detection Reagent	Réactif de détection conjugué COBAS® AMPLICOR® <ul style="list-style-type: none"> • Conjugué avidine-peroxydase de raifort (CN4) 	200 tests 2*100 tests
COBAS® AMPLICOR® Wash Buffer	Tampon de lavage COBAS® AMPLICOR® <ul style="list-style-type: none"> • Concentré de lavage 10X (WB) 	500 tests 2*250 tests
COBAS® AMPLICOR® Internal Control Detection Kit	Nécessaire de détection de témoins internes COBAS® AMPLICOR® <ul style="list-style-type: none"> • Suspension n°1 de la sonde du standard interne (IC PS1) • Suspension n°2 de la sonde du standard interne (IC4) 	100 tests 1*100 tests 1*100 tests

Procédure du test

A) Préparation des réactifs, échantillons et témoins pour 15 tests :

- Préparation de l'éthanol à 70% :

Ajouter 11ml d'éthanol à 95 % et 4 ml d'eau distillée.

- Préparation du réactif actif de lyse :

Passer au vortex le control interne (HCV IC)

Passer au vortex le tampon de lyse et il faut vérifier qu'il n'y ait pas de cristaux si c'est le cas le mettre pendant quelques minutes dans un bain marie.

Ajouter 100µl du control interne dans le flacon de tampon de lyse.

- Préparation des tubes

Numéroter chaque tube et les marquer en faisant un trait pour mieux repérer le culot lors de la centrifugation.

B) Pré-amplification :

- Ajouter 400µl réactif actif de lyse dans tous les tubes.

- Pour les échantillons

Ajouter 200µl de chaque échantillon dans les tubes portant les étiquettes correspondantes.

- Pour les témoins :

Ajouter 200µl de NHP dans chacun des deux tubes témoins.

Ajouter 20µl de chaque témoin HCV (-) et HCV (+) dans leur tube respectif.

- Passer tous les tubes au vortex.
- Incuber les tubes à 60°C pendant 10min.
- Passer au vortex les tubes pendant 10sec.
- Ajouter 600µl d'isopropanol à 100% (permet de précipiter les ARNases).
- Passer les tubes au vortex puis les laisser incuber à température ambiante pendant 2min.

- Centrifuger à 12 500- 16 000 x g pendant 15min. Pendant ce temps on peut préparer le mélange réactionnel HCV MMX.
- Après que la centrifugation soit finie enlever le maximum de surnageant avec précaution à l'aide d'une pipette de transfert sans toucher le culot et le jeter.
- Ajouter 1ml d'éthanol à 70% au culot (permet de laver).
- Passer tous les tubes au vortex.
- Centrifuger tous les tubes à 12 000-16 000x g à Température ambiante pendant 5min.
- Enlever une nouvelle fois le maximum de surnageant avec précaution à l'aide d'une pipette de transfert sans toucher le culot.

ATTENTION : Enlever un maximum de surnageant car **tout éthanol résiduel peut inhiber l'amplification !**

- Reprendre chaque culot avec 200µl HCV DIL.
- Passer tous les tubes au vortex pendant 10 secondes.

Remarque :

Ces échantillons doivent être utilisés dans les 3 heures qui suivent leur préparation ou peuvent être congelés à -70°C pendant 1 mois maximum.

Si les échantillons et les témoins traités ont été conservés congelés en attendant l'amplification, les ramener à température ambiante et les passer au vortex.

C) Transcription Inverse et Amplification

Remarque : Mettre en marche le thermocycleur 30 min avant le début de l'amplification.

- Préparation du Mélange réactionnel (HCV MMX)
Déterminer le nombre de couronnes nécessaire en fonction du nombre d'échantillons à amplifier.
Ajouter 100µl de HVC Mn²⁺ au contenu d'un flacon HCV MMX.
Mélanger le flacon en le retournant.

Déposer 50µl du mélange réactionnel actif dans chaque couronne. Placer les couronnes d'amplification dans une pochette refermable en plastique. Conserver le mélange à 2-8°C et l'utiliser dans les 4 heures suivant sa préparation.

- Ajouter 50µl de chaque échantillon et témoin préparés aux tubes de couronne appropriés contenant le mélange réactionnel actif.
- Bien fermer les tubes.
- Noter la position des témoins et des échantillons.
- Transférer les tubes dans la salle d'amplification / détection

Remarque : La transcription inverse et l'amplification doivent se faire dans les 45min suivant l'ajout des échantillons.

- Procéder aux tâches quotidiennes d'entretien du matériel :

Nettoyer : la station et la pointe de la tête de transfert des godets

Vérifier le niveau du réservoir du tampon de lavage et le remplir selon les besoins

Préparation du tampon de lavage actif (1X) :

Ajouter 1 volume de tampon de lavage à 9 volumes d'eau distillée

Bien mélanger

Vider le récipient de vidange

Mettre le système en route

Vérifier les seringues, les tubulures et la pointe de transfert.

- Chargement de l'analyseur COBAS AMPLICOR

Préparer les cassettes de réactifs :

1. Bien mélanger **CX PS1** au vortex

Ajouter 2.5ml de CX PS1 dans une cassette de CX4.

Placer la cassette sur le portoir de réactifs spécifique au test

2. Bien mélanger **IC PS1** au vortex

Ajouter 2.5ml d'IC PS1 à une cassette IC4

Placer la cassette sur le portoir de réactifs spécifique au test

3. Préparer la solution de substrat actif en déposant 5ml de **SB** dans une cassette de SB3

4. Placer le substrat actif sur le portoir pour réactifs d'usage général
5. Placer les cassettes de **DN4** et **CN4** sur le portoir pour réactifs d'usage général
6. Identifier et configurer les portoirs de réactifs comme génériques ou spécifiques au test à l'aide du clavier, du lecteur de codes-barres ou du logiciel **AMPLILINK**
7. Charger les portoirs de réactifs sur l'analyseur **COBAS AMPLICOR** à l'aide du clavier
8. Placer le portoir avec godets de détection sur plate-forme prévue à cet effet
9. Placer la ou les couronnes d'amplification dans le ou les segments de l'analyseur.
10. Charger les couronnes **A** sur l'analyseur **COBAS**
11. Créer une liste de travail pour la couronne **A**
12. Fermer hermétiquement le couvercle des segments du thermocycleur
13. Démarrer l'analyseur **COBAS**
14. Attendre que l'analyseur indique que le contrôle du chargement est positif

L'analyseur COBAS AMPLICOR exécute automatiquement la transcription inverse, l'amplification et la détection. Le cycle du programme dure pour : 15 échantillons environ 3h25 et pour 30 échantillons environ 3h50.

Retirer les couronnes d'amplification des segments du thermocycleur dans les 2h qui suivent la fin du cycle. Si la réaction de détection ne peut être effectuée dans les 2h les amplicons dénaturés sont stables jusqu'à 5 jours à 2-8°C

D) Détection LINEAR ARRAY

1. Laisser tous les réactifs revenir à température ambiante
2. Préchauffer un bain d'eau à 50°C (permet de redissoudre tout précipité)

Remarque : Il y a suffisamment de tampons d'hybridation, de lavage rigoureux, de lavage ambiant et de tampon au citrate actif, pour 100 bandelettes **LINEAR ARRAY** de génotypage du **HCV**. Ces tampons peuvent être conservés dans un récipient propre pendant 30 jours.

3. Préparer le tampon actif d'hybridation :
 - Examiner **SSPE** et **SDS** et si nécessaire chauffer à 50°C dans un bain d'eau
 - Ajouter 62.5ml de **SSPE** à 432.5ml d'eau distillée
 - Bien mélanger
 - Ajouter 5ml de **SDS** et bien mélanger
4. Préparer le tampon de lavage rigoureux :
 - Examiner **SSPE** et **SDS** et si nécessaire chauffer à 50°C dans un bain d'eau
 - Ajouter 25ml de **SSPE** à 965ml d'eau distillée
 - Bien mélanger
 - Ajouter 10ml de **SDS** et bien mélanger
5. Préparer le tampon de lavage ambiant actif
 - Examiner **SSPE** et **SDS** si nécessaire, chauffer à 50°C dans un bain d'eau
 - Ajouter 37.5ml de **SSPE** à 1447.5ml d'eau distillée
 - Bien mélanger
 - Ajouter 15ml de **SDS** et bien mélanger
6. Préparer le tampon actif de citrate
 - Examiner **CIT** et si nécessaire chauffer à 50°C dans un bain marie
 - Ajouter 50ml de **CIT** à 450ml d'eau distillée
 - Bien mélanger
7. Réchauffer le tampon actif d'hybridation et le tampon de lavage rigoureux dans un bain à 50°C pendant au moins 15min.
8. Préchauffer le bain d'eau à 55°C à une vitesse d'agitation de 60rpm

Remarque : Pour garantir la précision des conditions d'hybridation, il est important de vérifier que la température est de 55°C, que le niveau d'eau du bain marie est suffisant.

9. A l'aide de pince, déposer chaque bandelette (en fonction de nombre d'échantillon sans oublier les 2 contrôles) face numérotée vers le haut dans chaque puits et les identifier à l'aide d'un stylo.

10. Ajouter **4ml** de **tampon d'hybridation** actif préchauffé dans chaque puits
11. Déposer **100µl** d'**amplicon** dans chaque puits tout en agitant doucement
12. Couvrir le plateau d'un couvercle et placer dans bain marie à 55° sous agitation à 60rpm pendant **20min**
13. Préparation des conjugués actifs :
Ajouter **10µl** de **SA-HRP** à **5ml** de tampon de lavage rigoureux pour chaque bandelette. Bien agiter.
14. Retirer le plateau du bain d'eau agitée et retirer le tampon actif d'hybridation par aspiration sous vide.
15. Ajouter **4ml** de **tampon actif de lavage ambiant** dans chaque puits. Agiter doucement le plateau de typage 3 à 4 fois pour rincer les bandelettes. Aspirer immédiatement le tampon actif de lavage ambiant.
16. Ajouter **4ml** de **conjugué actif** à chacun des puits. Placer le plateau dans le bain d'eau à 55°C sous agitation à 60rpm pendant **20min**.
17. Retirer le plateau du bain d'eau agitée et retirer le conjugué actif par aspiration sous vide.
18. Ajouter **4ml** de **tampon actif de lavage ambiant** dans chaque puits. Agiter doucement le plateau de typage 3 à 4 fois pour rincer les bandelettes. Aspirer immédiatement le tampon actif de lavage ambiant.
19. Ajouter **4ml** de **tampon de lavage rigoureux** à chacun des puits. Remettre le plateau dans le bain d'eau à 55°C. Incuber **12min** sous agitation à 60rpm.
20. Retirer le plateau du bain d'eau agitée et retirer le tampon de lavage par aspiration sous vide.
21. Ajouter **4ml** de **tampon actif de lavage ambiant** dans chaque puits. Placer le plateau sur l'agitateur orbital à température ambiante pendant **5min** à une vitesse d'agitation de 60rpm.
22. Retirer le plateau de l'agitateur orbital et retirer le tampon actif de lavage par aspiration sous vide.
23. Ajouter **4ml** de **tampon actif au citrate** dans chaque puits. Placer le plateau sur l'agitateur orbital à température ambiante pendant **5min** à une vitesse d'agitation de 60rpm.
24. Préparer les substrats actifs :
Ajouter **4ml** de **SUB A** à **1ml** de **SUB B** pour chaque bandelette
Bien mélanger
Conserver à l'abri de la lumière directe
25. Retirer le plateau de l'agitateur orbital et retirer le tampon actif au citrate par aspiration sous vide
26. Ajouter **4ml** de **substrat actif** dans chaque puits. Placer le plateau sur l'agitateur orbital à température ambiante pendant **10min** à une vitesse d'agitation de 60rpm.
27. Retirer le plateau de l'agitateur orbital et retirer le substrat actif par aspiration sous vide.
28. Ajouter **4ml d'eau distillée** dans chaque puits. Placer le plateau sur l'agitateur orbital à température ambiante pendant **5min** à une vitesse d'agitation de 60rpm.
29. Retirer le plateau de l'agitateur orbital et retirer l'eau distillée par aspiration sous vide.
30. Ajouter **4ml d'eau distillée** dans chaque puits. Les bandelettes peuvent être conservées dans l'eau pendant 24h maximum jusqu'à l'interprétation des résultats.

Annexe 5. Résultats

Tableau IV : Niveaux de la charge virale des différents patients au stade pré-thérapeutique.

BPT	Groupe 1	Groupe 2
-----	----------	----------

	effectif	%	effectif	%
ARN non détecté	0	0,00	0	0,00
<2000	0	0,00	0	0,00
2000-800000	5	62,5	12	54,55
>800000	3	37,5	10	45,45
TOTAL	8	100	22	100

Tableau V : Effet du traitement de 3 mois sur la charge virale.

3 mois de traitement	Groupe 1		Groupe 2	
	effectif	%	effectif	%
ARN non détecté	4	44,44	22	51,16
<2000	5	55,56	10	23,26
2000-800000	0	0,00	10	23,26
>800000	0	0,00	1	2,33
TOTAL	9	100	43	100

Tableau VI : Effet du traitement de 6mois (24 semaines) sur la charge virale.

6mois de traitement	Groupe 1		Groupe 2	
	effectif	%	effectif	%
ARN non détecté	8	72,73	36	65,45
<2000	1	9,09	9	16,36
2000-800000	1	9,09	9	16,36
>800000	1	9,09	1	1,82
TOTAL	11	100	55	100

Tableau VII : Effet du traitement de 12mois (48 semaines) sur la charge virale.

12mois de traitement	Groupe 1		Groupe 2	
	effectif	%	effectif	%
ARN non détecté	4	57,14	19	55,88
<2000	2	28,57	7	20,59
2000-800000	1	14,29	5	14,71
>800000	0	0,00	3	8,82
TOTAL	7	100	34	100

Tableau VIII : Niveaux de la charge virale des différents patients 6 mois (24 semaines) après arrêt de traitement.

6 mois après arrêt de traitement	Groupe 1		Groupe 2	
	effectif	%	effectif	%
ARN nn dt=	4	57,14	14	63,64
<2000	3	42,86	3	13,64
2000-800000	0	0,00	3	13,64
>800000	0	0,00	2	9,09
TOTAL	7	100	22	100