

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche
scientifique
جامعة امحمد بوقرة بومرداس



Faculté des Sciences
Département de Biologie

Mémoire de fin d'études En vue de l'obtention du diplôme de MASTER
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Génétique

Thème

Infection par le virus de l'hépatite C : charges virales et génotypes.

Présenté par : DJENDIR Hadeil et LARIOUK Maroua

Soutenu publiquement le 18/09/2024 devant le jury composé de :

Dr AOUADI Nawel	MCB	FS/UMBB	Présidente
Dr HENNA Kamilia	MCB	FS/UMBB	Examinatrice
Dr BENHABYLES-BOUTTABA Narimen	MCA	FS /UMBB	Promotrice

Promotion 2023/2024

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste tableaux

Introduction.....1

Synthèse bibliographique

Chapitre I : l'hépatite C

1.L'hépatite	2
1.1.Historique.....	2
1.2.Virus de l'hépatite C.....	2
1.3.L'hépatite C viral.....	3
2. Epidémiologie de l'hépatite C.....	3
2.1. Prévalence en mondiale.....	4
2.2. Prévalence en Algérie	4
2.3.Modes de transmission du VHC.....	5
3. L'évolution de l'hépatite	7
4.Les techniques de diagnostic VHC.....	7
5. Les technique de biologie moléculaire	8
5.1.Détection qualitative de l'ARN du VHC.....	8
5.2. Quantification de l'ARN du VHC.....	8

Chapitre II: virologie

1. Structure et organisation génomique.....	9
1.1.Structure.....	9
1.2. Organisation génomique.....	10
2. Les protéines virales	11
3.Cycle cellulaire du VHC.....	12

Chapitre III .Génotypage

1.Variabilité génétique.....	14
1.1.Génotype.....	14
1.2.Lesquasi-espèces.....	14
1.3.Recombinaison génétique.....	15
2.Répartition géographique des génotypes.....	15
3. Principales méthodes de typage du VHC.....	16
3.1.Tests moléculaires de détermination du génotype.....	17

Chapitre IV : Matériels et méthodes

1.Prélevement et conservation	25
2.Méthodes.....	25
2.1.Génotypage du VHC par technique d'hybridation inverse.....	25
2.1.1.principe.....	25
2.1.1.1.L'extraction.....	25
2.1.1.2. Amplification.....	26
2.1.1.3. Hybridation inverse.....	27
3. Protocole (voir annexe)	30

Chapitre V : Résultats et discussion

1. Résultats	24
1.1.Distribution globale de la charge virale selon le nombre de patients atteints.....	24
1.2.Répartition des patients atteints d'hépatite C chronique selon le sexe (N=205)..	25
1.3.Répartition des patients atteints d'hépatite C chronique selon l'âge.....	26
1.4.Distribution globale des génotypes du VHC (N=205)	27
1.5.Comparaison des charges virales selon le génotype.....	28
1.6.Distribution des génotypes du VHC selon le sexe	29
1.7.Distribution des génotypes du VHC selon l'âge	30
1.8.Distribution géographique des différents génotypes en Algérie (N=205).....	31
1.9.Les différents sous-types génomiques du VHC retrouvés en Algérie.....	33
1.10. Distribution annuelle des différents génotypes du VHC de l'année 2016 à l'année 2024 (N=205)	35
2. Discussion.....	36
Conclusion.....	37

Références bibliographiques

Annexe

Résumé



Remerciements

Tout d'abord, on remercie Dieu le tout puissant qui nous avez fait ouvrir les portes du savoir, qui nous avez donné la force et la volonté de poursuivre nos études et d'effectuer ce travail.

Au terme de ce travail, nous aimerions adresser nos remerciements à toutes les personnes qui ont contribué au succès de notre stage et qui nous ont aidées lors de la rédaction de ce mémoire.

On tient à remercier notre promotrice **Docteur BENHABYLES-BOUTTABA Narimen**, pour avoir dirigé ce travail, pour ses conseils et critiques et ses encouragements qui nous ont énormément aidés à mener ce travail.

Nos sincères remerciements vont aux membres de jury, Mme Aouadi Nawel pour avoir accepté de présider ce jury et Mme Henna Kamilia qui a accepté d'examiner ce modeste travail.

Nous adressons nos remerciements les plus sincères au **Professeur GOURARI**, Chef de service de microbiologie à l'hôpital Mustapha d'Alger, pour nous avoir accueillies au sein de son laboratoire, pour son écoute, son implication, sa disponibilité et ses qualités humaines qui nous ont profondément touchées.

On voudrait exprimer nos remerciements les plus sincères à toute l'équipe du laboratoire de l'unité de virologie et en particulier **Docteur ZAROUKI Chahira**, pour leurs conseils, leur soutien et leur aide tout au long de notre stage. Ainsi nous remercions **LA BIOLOGISTE ASIA**, pour toute l'aide qu'elles nous ont apportées lors de la manipulation.

Je remercie mon oncle **EMKEIDECHE Rabeh** et son ami **Monsieur CHALEF Djilali**, qui nous ont aidés à trouver le lieu de stage.

Enfin, nous exprimons nos sincères remerciements aux membres de jury qui ont fait l'honneur d'être les examinateurs de ce mémoire.

Dédicaces

Je dédie ce travail à deux personnes que j'aime le plus sur terre et auxquelles je ne cesserai de dédier tous mes succès

A ma très chère mère EMKEIDECHE.A

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours; je t'aime très fort chère ange.

A mon cher père LARIOUK.A

Qu'est toujours à mes côtés près de moi pendant mes moments de faiblesse celui qui a toujours sur le réconforter et me consoler sans montrer les moindres sentiments.

A mes frères : Sid Ahmed ,Mohamed,Adem,Aymen **A mes sœurs :** Rania et Sabine

A ma famille de grande jusqu'au petit

A ma chère binôme, DJENDIRE Hadeil , pour sa entente et sa sympathie

A tous mes amis surtout : Asma ,Nesrin, Chahinez.

A ma meilleure amie RAFES Hadia, Elle était une source inestimable de soutien et d'inspiration tout au long de ce parcours, sa présence à mes côtés, ses encouragements constants et son amitié sincère ont été des piliers sur lesquels je me suis appuyée pour surmonter les défis et atteindre mes objectifs.

Enfin à tout l'ensemble du personnel de département Biologie et à toute la promotion
2023/2024.

LARIOUK Maroua

Dédicaces

Je dédie ce travail

A la femme qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils pour toute son assistance et sa présence dans ma vie mon adorable mère **CHADLI Djamila**

A l'homme, mon précieux offre du dieu ,je voudrais te remercier pour ton amour, ta générosité, ta compréhension... ma réussite et tout mon respect , mon cher père **DJENDIR Abed kader**

A mes frères **Manin Chakib** et **Ihab**

A toute ma famille

A mon binôme **LARIOUK Maroua** , avec qui j'ai passé l'une des meilleures années durant mon cursus universitaire

A ma deuxième famille, toute la famille **GOURA ,Dounia, Sara** qui m'ont toujours encouragé, et qui je souhaite plus de succès

A mes meilleures amies **Nawel, Amel, Maria,Bouchra** je ne peux pas trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des sœurs et des amies sur qui je peux compter.

DJENDIR Hadeil

Liste des abréviations

VHC:	Virus de l'hépatite C
RT PCR :	Transcription inverse de la réaction de polymérisation en chaîne
OMS	Organisation mondiale de la santé
VIH :	Virus de l'immunodéficience humaine
VHA:	Virus de l'hépatite A.
VHB :	Virus d'hépatite B.
ARN:	Acide ribonucléique
NT :	Nucléotide
NC:	Non codante
C:	Core
AC:	Anticorps
PCR:	Réaction de polymérisation en chaîne
RFLP:	Polymorphisme de longueur des fragments de restriction
ELISA :	Enzyme linked immunosorbent assay
EDTA :	Ethylène diamine tétra -acétique
TROD:	Test rapide d'orientation diagnostique.
HAT :	Hépatite associée à la transfusion
HTT1 :	Hépatite Totale Type 1
NS :	Les régions non codantes
TMA :	Amplification médiée par la transcription
ADN :	Acide désoxyribonucléique
HVR :	Régions hypervariables
INF:	Interféron
CD :	Cluster of differentiation
LDL :	Lipoprotéine de faible densité

SR.BI : Récepteur scavenger classe B type I
DC.SIGN : ICAM3-Grabbing spécifique aux cellules dendritiques sans
intégrine
L.SIGN : ICAM-3 spécifique au foie et aux ganglions lymphatiques Non-
intégrine capturant

Liste des figures

Figure 01:	Taux de prévalence du virus de l'hépatite C par pays. 2011.....	3
Figure 02:	Résumé de l'histoire naturelle de l'infection virale C.....	6
Figure 03:	Structure du virus de l'hépatite C.....	9
Figure 04:	Organisation génomique du VHC.....	10
Figure 05:	Le cycle viral du virus de l'hépatite C.....	13
Figure 06:	Arbre phylogénétique représentant les différents génotypes et sous-type du VHC.....	14
Figure 07:	Répartition géographique des différents génotypes.....	16
Figure 08:	Génome du VHC.....	19
Figure 09:	Hybridation inverse principe 1: des sondes oligo-nucléotidiques spécifiques des différents types du VHC et relatives aux régions 5'NC et C sont fixées sur la bandelette de nitrocellulose.....	19
Figure 10:	Hybridation inverse principe 2: le produit d'amplification (ADN) biotinylé est dénaturé et vient s'hybrider au niveau des sondes complémentaires.....	20
Figure 11:	Hybridation inverse principe 3: après une étape de lavage qui élimine l'ADN non fixées aux sondes, il y a liaison de la streptavidine marquée par la phosphatase alcaline (conjugué) à la biotine de l'hybride.....	20
Figure 12:	Hybridation inverse principe 4: après étape de lavage, on ajoute un chromogène BCIP/NBT (substrat) qui va réagir avec la phosphatase alcaline pour former un précipité de couleur violette/marron, qui entraîne la formation d'une série de bandes visibles sur la bandelette.....	21
Figure 13:	Lecture des bandes.....	22
Figure 14:	Distribution globale de la charge virale selon le nombre de patients atteints.....	24
Figure 15:	Répartition des patients atteints d'hépatite C chronique selon le sexe Les	

	résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas de prédominance de sexe.....	25
Figure 16:	Répartition des patients atteints d'hépatite C chronique selon l'âge.....	26
Figure 17:	Répartition globale des génotypes du VHC.....	27
Figure 18:	Comparaison des charges virales selon le génotype.....	28
Figure 19:	Distribution des génotypes du VHC selon le sexe.....	29
Figure 20:	Distribution des génotypes selon l'âge.....	30
Figure 21:	Les différents génotypes du VHC retrouvés en Algérie.....	32
Figure 22:	Les différents sous-types génomiques du VHC retrouvés en Algérie.....	33
Figure 23:	Ce profil correspond selon le tableau fourni par le kit au génotype 1b...	34
Figure 24:	Distribution annuelle des différents génotypes du VHC de l'année 2016 à 2024.....	35

Liste des tableaux

Tableau I	Les Modes de transmission du VHC.....	5
Tableau II	Ces profils correspondent selon le tableau fourni par le kit aux différents géotypes...	24
Tableau III	Distribution globale de la charge virale selon le nombre de patients atteints.....	24
Tableau IV	Répartition des patients atteints d'hépatite C chronique selon le sexe (N=205).....	25
Tableau V	Répartition des patients atteints d'hépatite C chronique selon l'âge (N= 205).....	26
Tableau VI	Distribution globale des géotypes du VHC.....	27
Tableau VII	Comparaison des charges virales selon le géotype.....	28
Tableau VIII	Distribution des géotypes du VHC selon le sexe (N=205)	29
Tableau IX	Distribution des géotypes du VHC selon l'âge (N=205)	30
Tableau X	Répartition géographique des différents géotypes en Algérie : (N=205)	33
Tableau XI	Les sous-types génomiques du VHC retrouvés en Algérie (N=205)	34
Tableau XII	Distribution annuelle des différents géotypes du VHC de l'année 2016 à l'année 2024.	35

Introduction

L'infection par le virus de l'hépatite C (VHC) est un problème de santé publique mondial entraînant une morbidité et une mortalité importantes. Plus de 170 millions de personnes dans le monde sont infectées par le VHC. Le virus de l'hépatite C fait l'objet d'une intense attention depuis sa découverte en 1989 (**Mohd Hanafiah, 2013**).

Le virus provoque rarement une hépatite fulminante, il provoque principalement une hépatite aiguë, généralement asymptomatique et se manifestant parfois par de la fatigue et un ictère. Malheureusement, 80 % des cas d'hépatite évoluent vers une hépatite chronique, ce qui conduit à 20 % des cas de cirrhose et, après 20 ans, 1 à 4 % des cas évoluent vers un carcinome hépatocellulaire (cancer du foie) (**Jean, 2006**).

À notre connaissance, il n'existe pas de données publiées sur la prévalence de l'infection par le VHC dans la population générale en Algérie, à l'exception d'une prévalence de 0,45 % chez les donneurs de sang publiée par l'Agence Nationale du Sang en 2014 (**Agence Nationale du Sang, 2014**).

L'objectif de ce travail est de connaître l'épidémiologie de la charge virale et le génotype en Algérie. Pour atteindre cet objectif, notre travail se présente comme suit :

- Une première partie qui constitue une revue de la littérature bibliographique sur le virus de l'hépatite c, l'organisation de son génome ainsi que sur sa variabilité génétique.
- La deuxième partie est consacrée à une étude expérimentale ainsi qu'aux matériels et méthodes utilisés dans cette étude.
- La troisième partie est dédiée à la présentation des différents résultats obtenus et leur discussion.
- Et en fin une conclusion qui résumera l'ensemble du travail réalisé.

I.1. Historique

L'hépatite C est une maladie nécro inflammatoire du foie, due à une infection par un virus hépatotoxique, le virus de l'hépatite C (VHC). Le VHC présente une remarquable tendance à établir une infection persistante chez l'hôte, dont la manifestation pathologique principale est une hépatite chronique. Dans le long terme, cette hépatite peut aboutir à l'apparition d'une cirrhose, avec des risques accrus d'insuffisance fonctionnelle et de développement d'un carcinome hépatocellulaire **(Enomoto, 1995)**.

L'existence du VHC a été soupçonnée une première fois au début des années 1970, date à laquelle la plupart des cas d'hépatites liées à des transfusions n'étaient pas dues à une infection par le virus de l'hépatite A ni de l'hépatite B. Pour cette raison, le terme de l'hépatite non-A, non-B fut introduit. C'est seulement à la fin des années 1980 que le VHC a été identifié, permettant la caractérisation du génome viral dans sa totalité **(Enomoto, 1995)**.

I.2. Virus de l'hépatite C

L'hépatite C est une maladie hépatique causée par un virus appartenant à la famille des Flavivirus. Ce virus, responsable des hépatites parentérales non liées au virus de l'hépatite B (hépatite non A non B), est un virus à ARN dont la période d'incubation varie généralement de 5 à 6 semaines. On distingue six génotypes différents, chacun ayant de nombreux sous-types. **(Belataf, 2002)**.

I.3. L'hépatite C viral

Les hépatites virales sont secondaires à une infection virale, elles représentent un groupe de maladies du foie caractérisées par une inflammation du parenchyme hépatique. L'hépatite est l'expression clinique de cette infection. Il existe 5 virus hépato tropes : les virus des hépatites A, B, C, D et E ; les virus des hépatites A à E (hépatites A virus (HAV), hépatites B virus (HBV), hépatites C virus (HCV), hépatites D virus (HDV) et hépatites E virus (HEV) **(Bihlè et Negro, 2009 ; de Niet et al., 2012)**.

Afin d'identifier lequel de ces virus est l'agent causal d'une hépatite, des tests sérologiques sont nécessaires. En effet, bien qu'appartenant à des familles différentes (d'un point de vue classification), tous ces virus induisent une hépatite aigüe. Mais, seuls les virus des hépatites B, C et D (HBV, HCV et HDV) induisent une infection chronique pouvant durer de nombreuses années. **(Armstrong et al., 2006)**

Toutefois, chez des patients immunodéprimés, de rares cas d'infections chroniques ont déjà été observés pour le HEV. Une hépatite chronique correspond à une persistance de l'infection virale qui peut entraîner sur le long terme une fibrose pouvant elle-même évoluer en cirrhose ou en carcinome hépatocellulaire (Bihl, 2009).

I.4. Epidémiologie de l'hépatite C

I.4.1. Prévalence mondiale

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), en 2012, 170 millions de personnes sont touchées par le VHC dans le monde (Lewis, 2011), Environ 150 millions d'entre elles sont infectées chroniquement par le virus de l'hépatite (HTT1). 3 à 4 millions de personnes sont infectées chaque année (HTT1) (Lewis, 2011) (HTT3) et plus de 350 000 individus meurent chaque année de pathologies hépatiques liées à l'hépatite C (HTT1). On distingue schématiquement plusieurs zones endémiques (selon le taux de l'infection VHC) (figure 1) :

- Zone de forte prévalence (plus de 2,9 %) : l'Égypte de 9% jusqu'à 50% dans certaines zones rurales égyptiennes (Shepard, 2005).
- Zone de moyenne prévalence (1 à 2,9%): Chine, USA, France.
- Zone de faible prévalence (< à 1%): Libye, Iran, Saoudia Arabia.



Figure 01. Taux de prévalence du virus de l'hépatite C par pays.

(Lavanchy, 2011) (Center for control disease and prevent)

I.4.2. Prévalence en Algérie

Faute d'études épidémiologiques récentes concernant la population générale Algérienne, on ne dispose que des estimations selon lesquelles la séroprévalence du VHC varierait 2,10%, dans le pays en 2014 (OMS, 2017).

Les wilayas les plus touchées sont : M'sila avec une incidence de 11,60 cas pour habitants. Les deux communes les plus touchées sont M'Sila (37,3% des cas) et Magra (32,8 %) ; Tamanrasset, le taux d'incidence a chuté, passant de 20,95% à 10,49 % cas pour habitants. Plus de la moitié des cas (59,16 %) ont été notifié dans la commune de Tinzaouatine. La wilaya d'Oum El Bouaki a enregistré un taux d'incidence de 9,03 % cas pour habitants, soit 65 cas au total dont 61,5% ont été notifiés dans la commune d'Oum El Bouaki et 20 % à Aïn M'Lila. A Tébessa, l'incidence enregistrée est de 8,72% cas pour habitants avec 78,5 % des cas notifiés dans la commune de Tébessa (OMS, 2017).

I.5. Modes de transmission du VHC

Le virus de l'hépatite C est essentiellement transmissible par contact direct avec le sang contaminé (Payne, 2014).

Tableau I : Les Modes de transmission du VHC

<p>Transfusion de produits sanguins:</p>	<ul style="list-style-type: none"> - D'une intervention chirurgicale importante. - D'une hémorragie importante. - D'une anémie profonde non tolérée (Vrielingh <i>et al.</i>, 1995).
<p>Toxicomanie</p>	<ul style="list-style-type: none"> - L'usage de drogues par voie intraveineuse (lié au partage des seringues et du matériel de préparation). • L'usage de drogues par voie nasale est probablement aussi un mode de contamination du fait du partage d'une même paille (Vrielingh <i>et al.</i>, 1995).
<p>Transmission Familiale :</p>	<p>La transmission familiale entre sujets habitant sous le même toit est très rare et elle est le plus souvent liée au partage d'objets courants, en particulier objets de toilette (rasoir, brosse à dent, coupe ongle, pince à épiler) ou objets usuels (aiguilles de couture, outils) ayant pu être en contact avec le sang de la personne infectée par le virus C. Ce mode de transmission est favorisé par une proximité forte et des conditions d'hygiène insuffisantes (Vrielingh <i>et al.</i>, 1995).</p>

Risque nosocomial	Ce mode de contamination a pu être fréquent quand certains matériels d'injection ou de chirurgie étaient non jetables, mais réutilisés après stérilisation plus ou moins adéquates. Actuellement, ce risque persiste toujours à cause de l'utilisation d'appareils à usage médical
Tatouages piercing et scarifications / hidjama	Ces pratiques pourraient être à l'origine de contaminations lors de l'usage de matériel non jetable dont la stérilisation a pu être insuffisante voire inexistante
Risque Professionnel	La contamination professionnelle liée à une blessure accidentelle avec du matériel souillé est un mode de transmission mineur du VHC (Evelyne, 2007). L'hépatite C n'est pas propagée par les aliments ou l'eau ou encore par un simple contact tel qu'une étreinte, un baiser ou le partage de nourriture ou d'une boisson avec une personne infectée

I.6. L'évolution de l'hépatite C

L'histoire naturelle de l'infection virale C est caractérisée par une hépatite aiguë survenant 5 à 45 jours après la rencontre avec le virus puis, le risque principal est l'évolution vers la chronicité observée chez 70 à 80% des patients, cela signifie qu'environ 20-30% des patients vont guérir spontanément. Le risque de l'hépatite chronique C est l'évolution vers la cirrhose dans 20% des cas, la cirrhose elle-même expose à ses propres complications d'hypertension portal, insuffisance hépatocellulaire, qu'à la survenue du carcinome hépatocellulaire avec une incidence annuelle de 3 à 5% à partir de la constitution de la cirrhose (**Figure 02**) (**Pol, 1998**).

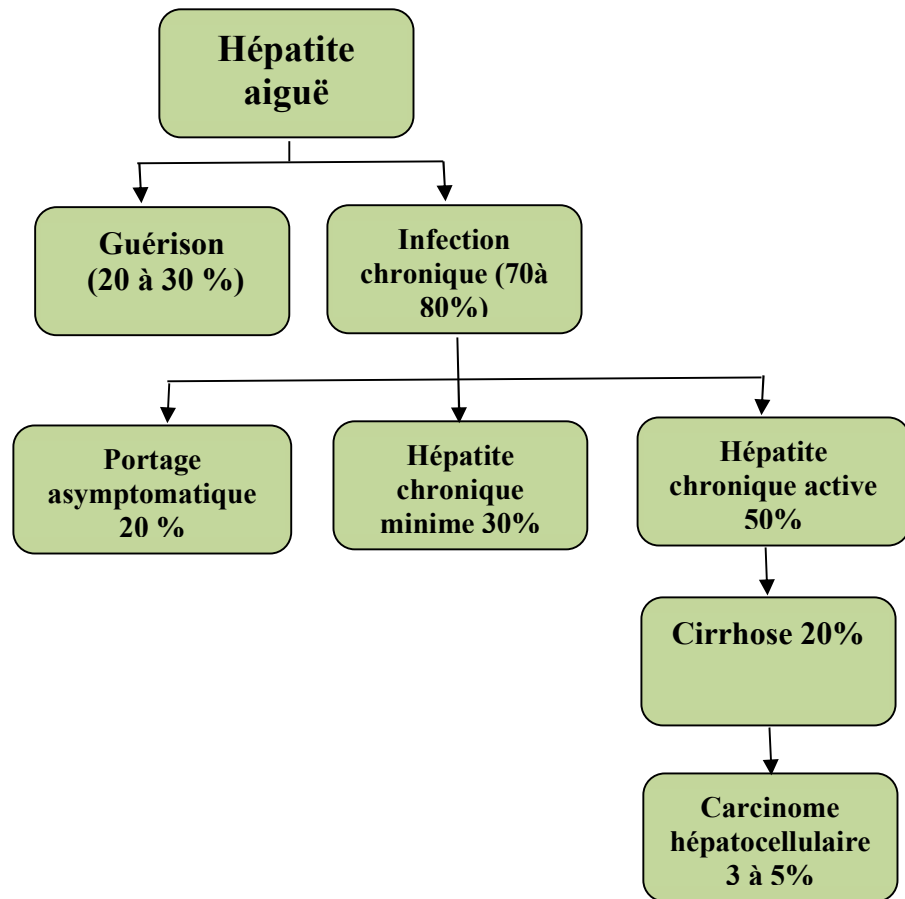


Figure 02. Résumé de l'histoire naturelle de l'infection virale C (Belataf, 2002).

1.6.1. Hépatite aiguë

Les cas d'hépatite C aiguë restent relativement rares ils ne représentent que 10% des cas d'hépatite aiguë en Europe. L'hépatite C aiguë reste le plus souvent asymptomatique chez la majorité des patients. Dans 20% des cas l'hépatite C est ictérique, mais dans la majorité des cas (80%) l'hépatite est anictérique avec peu ou pas de symptômes.

De plus les symptômes pouvant être retrouvés lors de l'hépatite C aiguë ictérique ou non ne sont pas spécifiques (Pawlotsky *et al.*, 2014).

1.6.2. Hépatite chronique

L'hépatite chronique par le VHC est définie par la persistance de l'ARN du VHC 6 mois après l'hépatite aiguë, elle est responsable de 70% des cas d'hépatites chroniques. Le passage à la chronicité est dépendant de certains facteurs. Ce dernier est augmenté avec l'âge, le sexe masculin et le déficit immunitaire (Deuffic, 1999).

1.7. Les techniques de diagnostic VHC

Le diagnostic des infections par le VHC repose sur deux types de tests : les tests indirects, qui mettent en évidence les anticorps dirigés spécifiquement contre le virus, et les tests directs fondés sur les techniques de biologies moléculaires, qui mettent en évidence les constituants de la particule virale (Manns et al.,2021)

1.7.1. Les tests indirects ou sérologiques

Les tests sérologiques sont des tests immuno-enzymatiques principalement de type ELISA (enzyme linked- immuno-sorbent-assay). Ils utilisent des protéines recombinantes ou des peptides synthétiques viraux, codés à la fois par les régions structurales (capside, enveloppe) et les régions non structurales (NS3, NS4 et NS5) du génome viral (K. A. K. B. J,2011)

1.7.1.1. Test ELISA

C'est un test immuno-enzymatique ELISA de troisième génération, sa spécificité est excellente de l'ordre de 99% et la sensibilité est en moyenne de 98% chez les patients porteurs du virus de l'hépatite C (Jopling *et al.*, 2005).

1.7.1.2. Les TROD: des tests rapides d'orientation diagnostique

On appelle «test rapide d'orientation diagnostique (TROD)», un test unitaire, à lecture subjective, de réalisation simple et conçu pour donner un résultat dans un délai court (moins de 30 minutes généralement) lorsqu'il est pratiqué auprès du patient. Il peut être réalisé sur sang total salive plasma ou sérum en fonction des matrices revendiquées par le fabricant pour son produit (Carrère *et al.*, 2004; Jopling *et al.*, 2005). Ils permettent de détecter en quelques minutes une infection au virus de l'hépatite C (VHC) (Thomas *et al.*, 1995).

1.7.2. Les techniques de biologie moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire appliquées au diagnostic des infections par le VHC peuvent être classées en trois catégories : les méthodes de détection de l'ARN du VHC, les méthodes de quantification de l'ARN et les méthodes de génotypage (Dhumeaux *et al.*, 2014).

1.7.2.1. Détection qualitative de l'ARN du VHC

L'ARN du VHC est présent en quantités insuffisantes dans le sérum et les tissus pour être détecté par les techniques d'hybridation classiques. Une étape d'amplification préalable est donc nécessaire. Les techniques d'amplification de la cible permettent de produire un grand nombre de copies (ADN double brin lors de la réaction en chaîne par polymérase ou PCR, ARN simple brin lors de l'amplification par transcription médiée ou TMA) après transcription inverse de l'ARN viral en ADN complémentaire grâce à une réaction enzymatique. Ces copies deviennent

visibles soit par électrophorèse et coloration spécifique de l'ADN, soit par hybridation spécifique sur des microplaques. Les techniques de PCR qualitative sont actuellement les plus sensibles pour détecter l'ARN du VHC (Leroy *et al.*, 2016).

1.7.2.2. Quantification de l'ARN du VHC

La quantification de l'ARN du VHC (ou mesure de la charge virale) mesure le niveau de réplication virale dans l'organisme. Elle repose sur deux types de techniques : les techniques d'amplification de la cible (PCR ou TMA) et les techniques d'amplification technique compétitive, où un standard interne en quantité connue est ajouté à l'échantillon, extrait et reverse transcrit en parallèle avec l'ARN viral, puis amplifié en compétition avec celui-ci. La comparaison des résultats de la cible (ARN viral) et du standard, permet la quantification. De nouvelles techniques fondées sur l'amplification en temps réel (real time PCR) sont en cours de développement. Ces techniques bénéficient d'une sensibilité, d'une spécificité et d'un intervalle de quantification linéaire accrus. Les techniques d'amplification du signal ont pour objectif, après hybridation de l'ARN viral à un support solide, de fixer sur cet ARN, un grand nombre de molécules « signal » (enzymes). Ces enzymes catalysent la transformation d'un substrat en un composé détectable. La quantité de composé produite est comparée à une courbe étalon, tracée en parallèle avec des standards en quantités connues et permet la quantification. Les avantages de cette méthode sont sa spécificité et sa reproductibilité. Elle quantifie de façon équivalente les différents génotypes du VHC.

1.7.2.3. Technique de génotypage

Le génotypage du VHC permet en particulier l'étude de sa variabilité génétique. Les techniques de génotypage sont fondées sur une amplification initiale par PCR. En routine, on peut utiliser les techniques d'analyse du polymorphisme de restriction des fragments amplifiés (restriction fragments length polymorphisme analysis ou RFLP) ou des techniques standardisées d'hybridation inverse, fondées sur l'utilisation de sondes oligo nucléotidiques spécifiques des différents génotypes et sous-type du VHC (Thomas *et al.*, 1995).

Chapitre II

Etude virologique du VHC

I.1. Structure et organisation génomique

I.1.1. Structure

Le VHC appartient à la famille des *Flaviviridae*, genre *hépacivirus*. Il se caractérise par une enveloppe de 55 à 65 nm de diamètre qui entoure une capsidie icosaédrique laquelle héberge un génome d'ARN (Bartenschlager et al., 2009) (Figure 3).

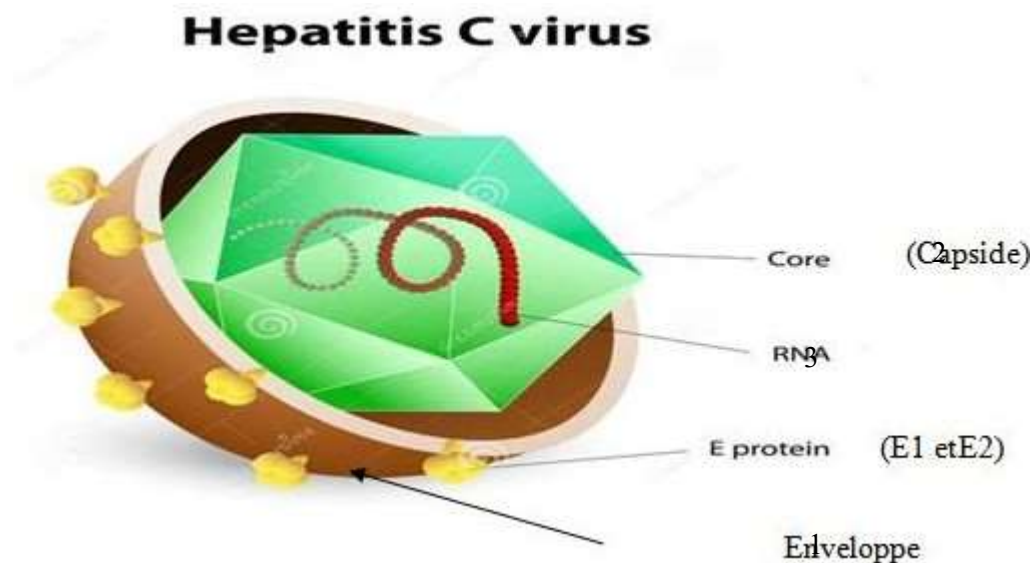


Figure 03. Structure du virus de l'hépatite C (Penin,2004).

- **L'enveloppe:** il s'agit d'une enveloppe lipidique qui entoure la nucléocapside (capsidie), elle provient des membranes du réticulum endoplasmique des cellules infectées et sur laquelle sont ancrées sous forme d'hétérodimères deux glycoprotéines virales E1 et E2, ces dernières permettent au virus de se fixer sur la cellule du foie (hépatocyte) avant d'y pénétrer (Shepard, 2005).
- **La capsidie protéique:** est formée par l'oligomérisation de la protéine core, il s'agit d'une coque constituée de protéines permettant de protéger le virus (Khelifa, 2008).
- **Le génome:** est une molécule d'acide ribonucléique (ARN) monocaténaire de polarité positive et d'une longueur de 9500 à 12500 nucléotides (nt) (Khelifa, 2008).

I.1.2. Organisation génomique

Le génome du VHC comporte une région codante flanquée à ses deux extrémités 5' et 3' de régions non codantes (Amaury, 2007) (Figure 04).

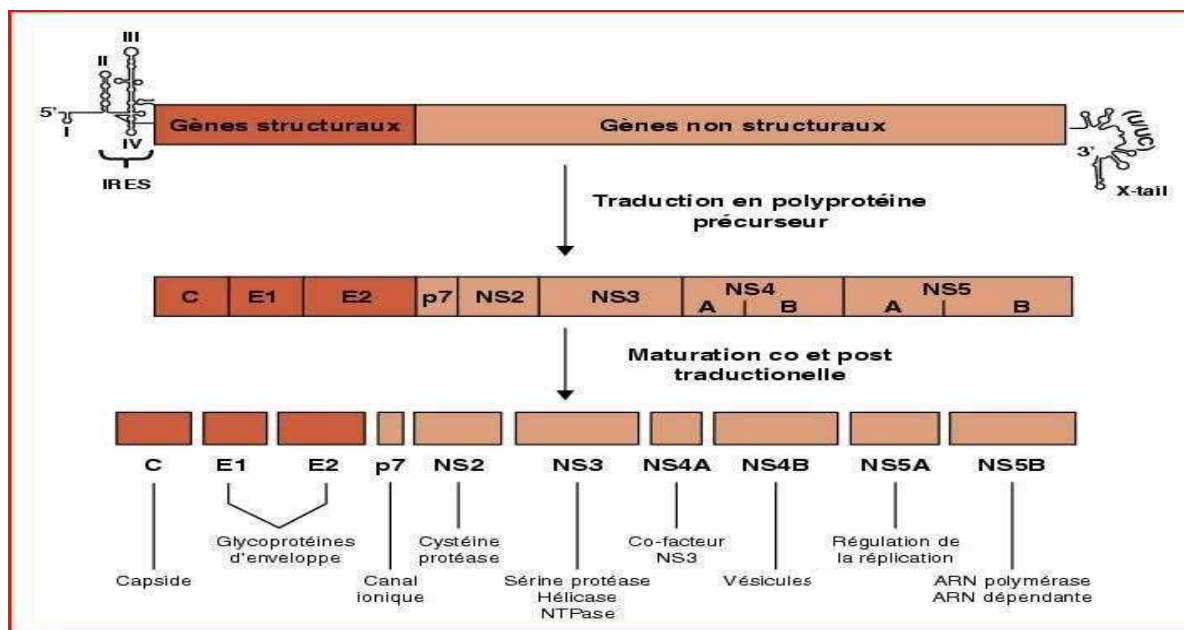


Figure 04. Organisation génomique du VHC (Guévin, 2012).

I.1.2.1. Les régions non codantes (NC)

- **La région 5' NC**

L'extrémité 5' est une région hautement conservée d'une longueur de 341 à 349 nt. Elle forme une structure secondaire et tertiaire comprenant 4 domaines majeurs (I à IV), un pseudo-nœud et une hélice. Elle joue un rôle important dans la synthèse de protéines virales par la régulation négative de la traduction des protéines virales et par l'initiation de la traduction (Khelifa, 2008)

- **La région 3'NC**

C'est une courte séquence non traduite qui renferme une région très conservée de 98 nt qui permettrait l'initiation de la synthèse du brin complémentaire d'ARN négatif au cours de la réplication (Khelifa, 2008).

I.1.2.2. La région codante

Cette région comporte un cadre de lecture ouvert unique, formée de plusieurs gènes qui codent pour une poly-protéine précurseur de toutes les protéines virales structurales et non structurales du VHC (Khelifa, 2008).

I.2. Les protéines virales

I.2.1. Les protéines structurales

I.2.1.1. La protéine de la capsid C (Core) codée par le gène C

Les molécules de la protéine C native se lient à l'ARN viral, ce qui initie leur polymérisation nécessaire à la formation de la capsid. Elles interagissent avec divers éléments cellulaires et ont également la capacité de moduler l'expression de certains gènes impliqués dans le cycle cellulaire. (Khelifa, 2008).

I.2.1.2. Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 codées par les gènes E1 et E2

Ce sont des protéines transmembranaires, organisées en complexes hétéro dimériques non covalents ancrés dans l'enveloppe virale par leur extrémité carboxy-terminale.

La glycoprotéine E1 porte le peptide nécessaire à la fusion après l'endocytose de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome.

La glycoprotéine E2 est responsable de l'attachement des particules à la cellule, elle présente à son extrémité N-terminale une région hypervariable (HVR1) qui renferme au moins un des déterminants antigéniques, cible identifiée d'anticorps. (Khelifa, 2008).

I.2.2. Les protéines non structurales

I.2.2.1. La protéine p7 codée par le gène p7

Cette protéine forme un canal ionique à Ca^{2+} , impliquée également dans la réplication du virus (Zeba, 2009).

I.2.2.2. La protéine NS2 codée le gène NS2

Cette protéine est une métalloprotéase douée d'une activité autocatalytique dépendante du zinc qui permet la coupure de la jonction NS2-NS3 (Amaury, 2007) (Khelifa, 2008)

I.2.2.3. La protéine NS3 codée par le gène NS3

C'est une protéine hydrophile présentant une triple activité enzymatique:

- Une activité sérine protéase.
- Une activité NTPase (phosphatase des nucléotides) et une activité hélicase (Amaury, 2007, Khelifa, 2008).

I.2.2.4. La protéine NS4A codée par le gène NS4

Elle permet l'activation et la stabilisation de la sérine protéinase NS3, l'ancrage de NS3, l'interaction avec la NS5A et la régulation de la phosphorylation de NS5A (Amaury, 2007, Khelifa, 2008).

I.2.2.5. La protéine NS4B codée par le gène NS4

Elle induit la formation de vésicules intracellulaires servant de support à la réplication du virus (Guévin, 2012).

I.2.2.6. La protéine NS5A codée par le gène NS5

Elle joue un rôle important dans la régulation de la réplication et semblerait intervenir dans la résistance du virus à l'IFN α (Amaury, 2007 ; Khelifa, 2008).

I.2.2.7. La protéine NS5B codée par le gène NS5

Elle correspond à l'ARN polymérase ARN dépendante du virus indispensable à la réplication viral (Amaury, 2007 ; Khelifa, 2008).

I. 3. Cycle cellulaire du VHC

Pour infectées les hépatocytes, le VHC passe par les étapes suivantes:

- Interaction des glycoprotéines virales de l'enveloppe avec une série de récepteurs qui sont : la tétraspanine (CD81), le récepteur BI des macrophages « scavenger » (SR-BI), les molécules d'adhésion DC-SIGN et L-SIGN et la lipoprotéine de faible densité (LDL) (Chavaliez, 2007).
- Internalisation du virus par endocytose (Zeba, 2009).
- Décapsidation et libération du génome viral dans le cytoplasme qui servira d'une part à la **réplication virale** grâce à la synthèse par l'ARN polymérase, de brins à polarité négative, appelés "brins négatifs ", complémentaires de l'ARN viral. Ces brins néosynthétisés serviront de matrice pour la synthèse de nouvelles molécules d'ARN virales à polarité positive. Et d'autre part à **la synthèse de la polyprotéine**, cette dernière subira une maturation et un clivage en protéines structurales et non structurales (Chavaliez, 2007).
- Encapsidation de l'ARN à polarité positive dans le réticulum endoplasmique (Chavaliez, 2007).
- Formation de l'enveloppe virale par bourgeonnement dans la lumière du réticulum endoplasmique (Zeba, 2009).
- Sécrétion de nouvelles particules virales par exocytose dans l'espace péri cellulaire par l'appareil de Golgi (Ashfaq, 2011) (Figure 5).

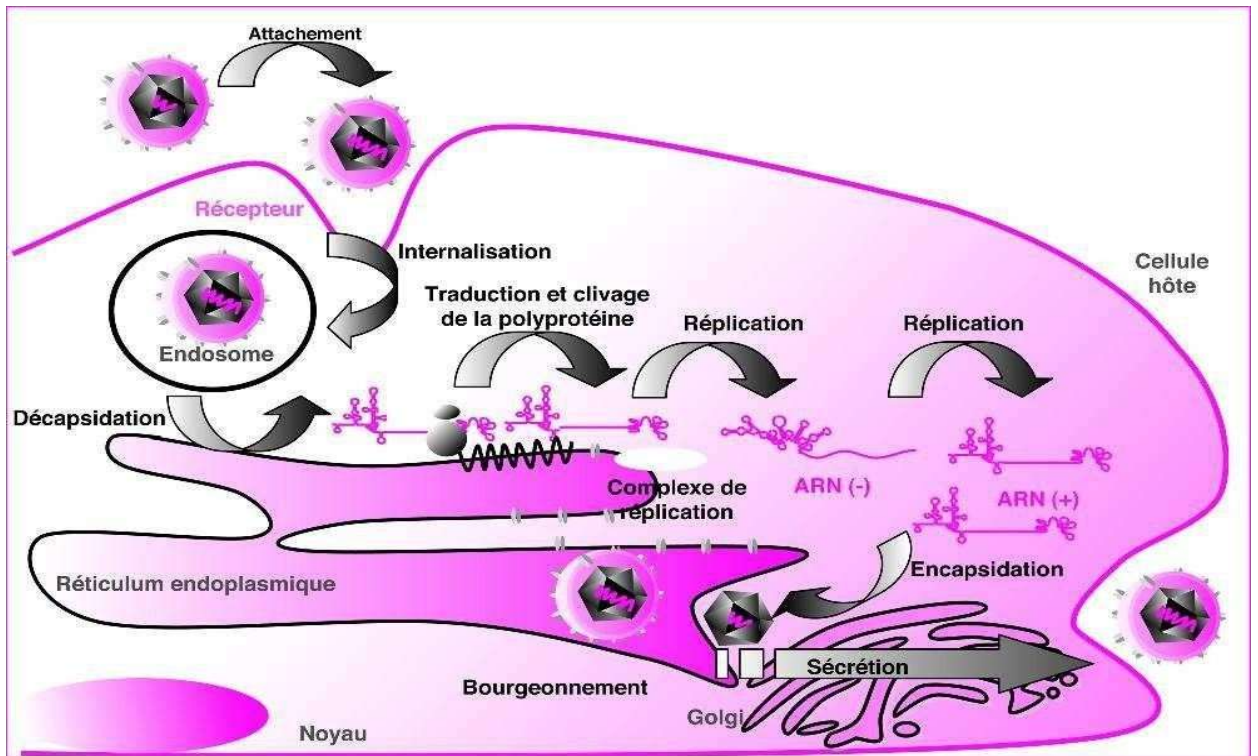


Figure 05. Le cycle viral du virus de l'hépatite C (Schvoerer, 2003).

Chapitre III

Génotypage

I.1. La variabilité génétique

I.1.1. Génotype

Un système de classification a été proposé en 1994 par *Simmonds et ses collaborateurs*, fondé sur la seule comparaison des régions 5'NC des différents isolats, pour caractériser les génotypes. Cependant, la nomenclature a été redéfinie et simplifiée en 1998, elle repose sur l'analyse phylogénétique des régions C/E1, NS5B ou de la séquence complète du génome (**Simmonds et al., 2005**).

Le VHC montre une importante diversité génétique, conséquence du défaut d'activité correctrice de l'ARN-polymérase ARN-dépendante (introduction de substitution) et d'une absence d'activité 5'-3' exonucléasique (absence de correction d'erreur). Le taux moyen de mutations nucléotidiques varie entre 1,4 et 1,9.10⁻³ substitution par nucléotide et par an (**Ogata et al., 1991; Okamoto et al., 1992**).

Les variants du VHC sont ainsi classés en sept types, puis en sous-types correspondant aux sous-ensembles de virus les plus reliés phylogénétiquement au sein d'un même type. Le type est désigné par un chiffre arabe (de 1 à 7) auquel est attribué une lettre minuscule (a, b, c...) correspondant au sous-type (voir figure 06) (**Bukh, 2005 ; Donald et al., 1992**).

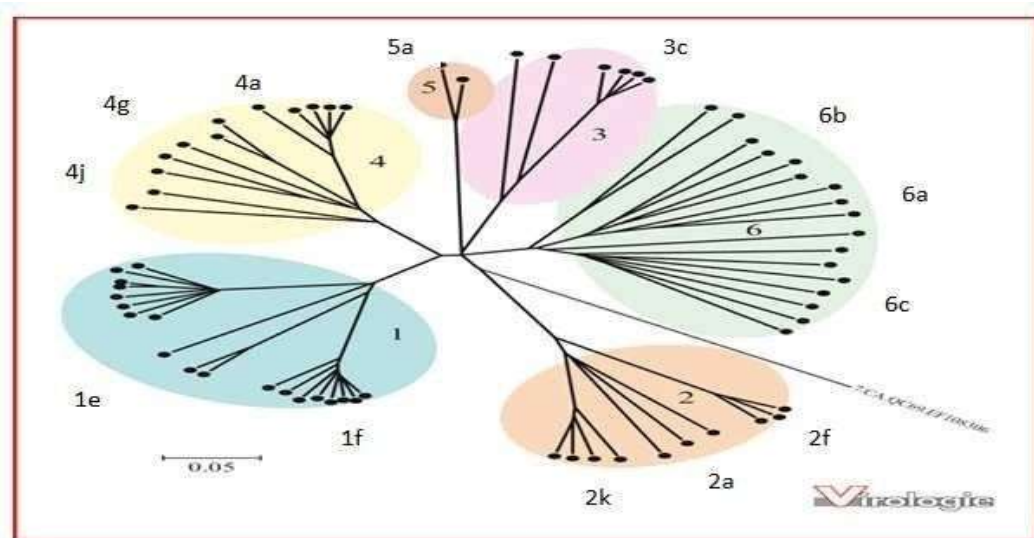


Figure 06. Arbre phylogénétique représentant les différents génotypes et sous-types du VHC (**Henquell, 2011**).

I.1.2. Les quasi-espèces

C'est la population formée de l'ensemble des variants viraux appartenant à un même génotype, résultant des mutations ponctuelles sur le génome ce qui explique l'existence à un

moment donné d'un mélange complexe de molécules d'ARN. L'ensemble des variants de la quasi-espèce ne diffèrent entre eux que par quelques mutations (plus de 90 % d'homologie de séquence nucléotidique) (**Asselahet *al*, 2000**).

I.1.3. Recombinaison génétique

La découverte d'un virus chimère issue d'un événement de recombinaison homologue inter- génotypique (types 2k/1b) qui a été identifié à Saint-Petersbourg en 2002. Depuis, un nombre restreint de virus recombinants inter-génotypiques ou intra-génotypiques a été caractérisé *in vivo*. Le point de recombinaison est préférentiellement localisé entre les gènes non structuraux NS2 et NS3 (**Gaudy *et al.*, 2005**) (**Legrand-Abravanel, 2008**)

I.2. Répartition géographique des génotypes

La répartition géographique des différents génotypes du VHC variable d'un continent à l'autre et même d'un pays à l'autre. Néanmoins, cette répartition peut être estimée schématiquement de la façon suivante (Figure 7) :

- **Génotype 1** : le génotype 1 (1a et 1b) est le plus fréquent dans le monde entier : on cite les pays de l'Asie, de l'Afrique Sub-saharienne, de l'Europe de l'est (**Goffard, 2012**)
- **Génotype 2** : le génotype 2 (2a, 2b et 2c) est le plus courant en Amérique, en Ouest Afrique sub-saharienne et en Europe de l'Ouest (**Goffard, 2012**)
- **Génotype 3**: est le plus fréquent en Asie, en Europe de l'est et en Amérique du Nord (**Legrand-Abravanel, 2008**)
- **Génotype 4**: est le plus courants en Egypte et en Moyen-Orient (**Goffard, 2012**)
- **Génotype 5**: Il se trouve majoritairement en Afrique du sud (**Goffard, 2012**)
- **Génotype 6**: est le plus souvent retrouvé en Asie du sud-est (**Zein, 2000**)
- **Génotype 7**: est retrouvé dans la République démocratique du Congo (Afrique centrale)

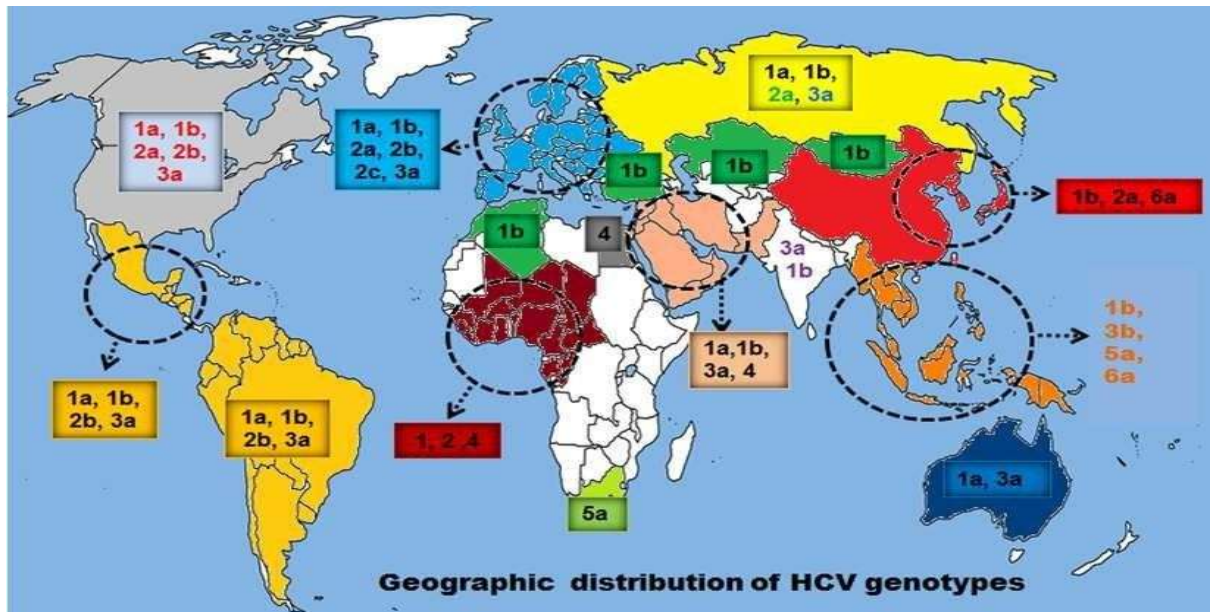


Figure 07. Répartition géographique des différents génotypes de VHC (Goffard, 2012).

I.3. Principales méthodes de typage du VHC

Il existe plusieurs méthodes permettant de typer le VHC, soit à partir des AC anti-VHC (sérotypage), soit à partir de l'ARN viral (génotypage) :

Le sérotypage par ELISA compétition:

- Il consiste à rechercher des anticorps spécifiques des divers sérotypes VHC (1 à 6) dans le sérum ou le plasma à l'aide de peptides de la région NS4, représentatifs des différents sérotypes.
- Le sérotypage ne permet pas le sous-typage car les épitopes de la protéine NS4 sont relativement conservés entre les différents sous-types d'un même type. Par ailleurs, certains sujets ne développent pas d'anticorps anti-NS4, ils sont par conséquent non sérotypable et ils représentent 20 à 25% des cas. Cette technique présente l'avantage de pouvoir déterminer le sérotype à partir de sérums de patients non virémiques (Leruez- Villeet al, 1998) (Pawlotsky *et al.*, 1997).

I.3.1. Tests moléculaires de détermination du génotype: Génotypage

Le génotypage du VHC permet l'étude de sa variabilité génétique. Les techniques de génotypage sont fondées sur une amplification préalable d'une partie ou de la totalité du génome viral par PCR (Zeba, 2009).

I.3.1.1. Séquençage

Le séquençage est la technique de référence puisqu'elle consiste en une analyse de la séquence nucléotidique de la souche donnée, qui s'effectue dans différentes régions du génome viral, le plus souvent les régions NS5B, E1 et la capsid. Il sert de référence à la constitution des arbres phylogéniques permettant de classer les isolats en types et sous-types. Les séquences ainsi identifiées sont comparées aux séquences enregistrées dans les différentes banques de données (**Asselah, 2000**)

I.3.1.2. La PCR en temps réel

Après une RT-PCR d'une séquence cible du génome du VHC, les génotypes sont détectés à l'aide de sondes Oligo nucléotidiques marquées par un fluorochrome spécifique au génotype.

I.3.1.3. Etude du polymorphisme de restriction

L'étude du polymorphisme de restriction (restriction fragment length polymorphisme, RFLP) consiste à réaliser une amplification d'une région donnée du génome du VHC (le plus souvent les régions 5'NC et NS5B), suivie d'une coupure du produit d'amplification à l'aide de plusieurs enzymes de restriction, puis la séparation de ces fragments par électrophorèse. Le choix approprié des combinaisons d'enzymes permet d'obtenir des fragments de taille variable caractéristique de type ou de sous-type. Cette technique, peu onéreuse, permet de différencier dans 80 % des cas les sous-types du VHC (méthode demoins au moins utilisée) (**Asselah, 2000**).

I.3.1.4. Hybridation inverse

Cette technique consiste en une amplification de la région 5'NC du VHC, puis en une hybridation des produits d'amplification avec des sondes nucléotidiques spécifiques des différents types et sous-types. Ces sondes sont soit immobilisées sur bandelette de nitrocellulose, soit fixées dans des puits d'une micro-plaque. L'hybridation est ensuite révélée par une méthode colorimétrique enzymatique. Cette technique, de réalisation simple est très informative pour la détermination des types et sous-types dans près de 96 % des cas (**Asselah, 2000**).

Matériel et méthodes

Au cours de l'étude prospective que nous avons effectué au niveau du service de microbiologie du CHU Mustapha Bacha durant la période de Mai 2024 jusqu'à septembre 2024, nous avons testé **16** sérums de patients atteints d'hépatite C chronique.

Nous avons également effectué une étude rétrospective en analysant les résultats de géotypages effectués sur **189** sérums pendant la période de 2016 jusqu'à 2024. Nous allons donc analyser les résultats d'un total de **205** échantillons.

I. Prélèvements et conservation

Les échantillons sanguins prélevés dans des tubes EDTA vont subir une centrifugation afin de récupérer le plasma qui sera conservé à +8°C pour quelques jours, sinon congelé à - 20°C.

II. Méthodes

II.1. Géotypage du VHC par technique d'hybridation inverse (INNO-LIPAHCV2.0, Innogenetics/ Bayer HC)

Ce test de deuxième génération amplifie deux régions du génome viral : la région 5'NC et la région C. Contrairement au test de première génération, qui n'amplifiait que la région 5'NC, ce test de deuxième génération permet une meilleure discrimination entre les sous-types 1a et 1b. De plus, il permet de distinguer certains sous-types du géotype 6 (de c à i), qui étaient souvent confondus avec le géotype 1.

II.1.1. Le principe

Dans ce test, il existe 3 opérations principales :

II.1.1.1. L'extraction

L'extraction de l'ARN comporte quatre étapes : la lyse, la séparation, la purification et l'élution d'acide nucléique virale.

II.1.1.2. L'amplification

Amplification de l'ADNc par RT-PCR à l'aide d'amorces complémentaires, spécifiques du VHC consiste à amplifier la région 5'NC et la région C.

I.1.1.3. Hybridation inverse

Après l'extraction et l'amplification de l'ARN viral, l'hybridation permet de révéler les différents génotypes en utilisant des amorces biotinylées. Cela produit de l'ADN double brin biotinylé. Cet ADN est ensuite dénaturé pour être hybridé avec des sondes nucléotidiques spécifiques aux différents types et sous-types du VHC, fixées sur une bandelette de nitrocellulose. Cette technique permet non seulement de déterminer le génotype, mais aussi de sous-typier le VHC. Les différentes étapes d'hybridation inverse sont illustrées dans les figures suivantes:

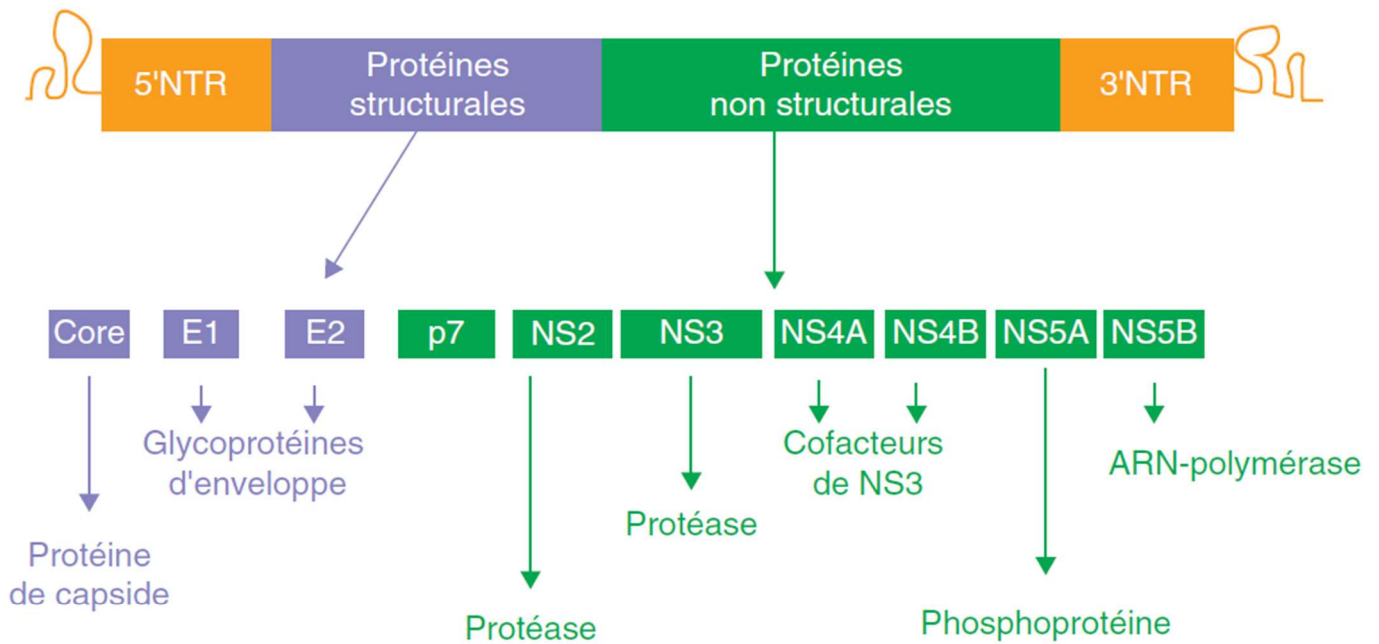


Figure 08. Génome du VHC (Le Guillou-Guillemette *et al.*, 2019).

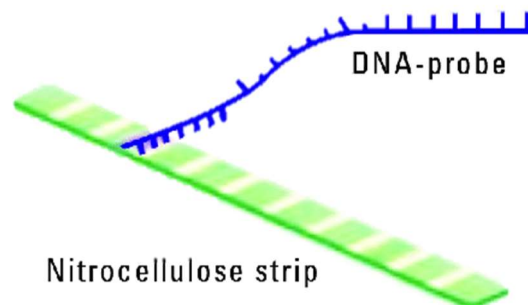


Figure 09. Hybridation inverse principe 1: des sondes oligo-nucléotidiques spécifiques des différents types du VHC et relatives aux régions 5'NC et C sont fixées sur la bandelette de nitrocellulose. (Pawlotsky, 2016)

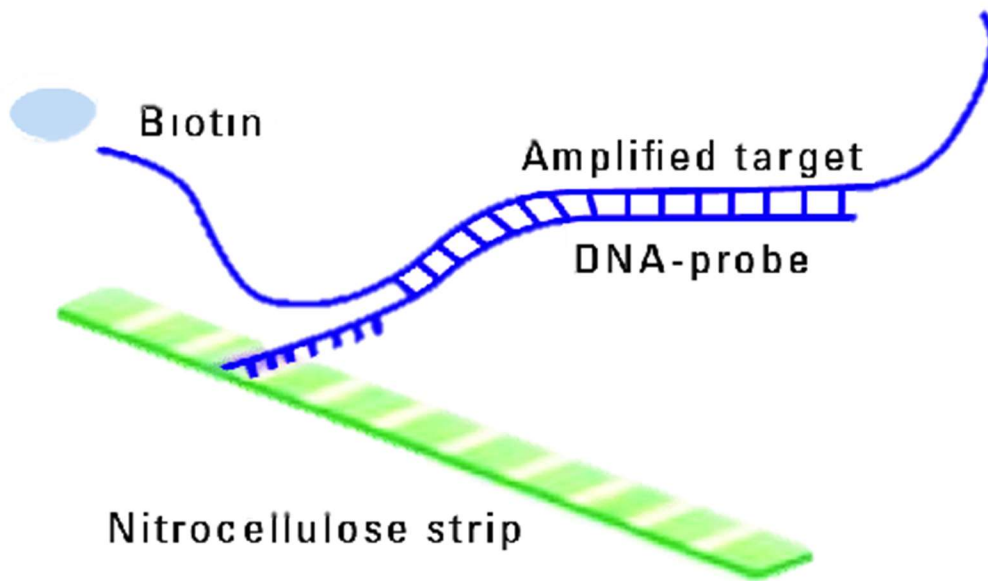


Figure 10. Hybridation inverse principe 2: le produit d'amplification (ADN) biotinylé est dénaturé et vient s'hybrider au niveau des sondes complémentaires (Pawlotsky, 2016)

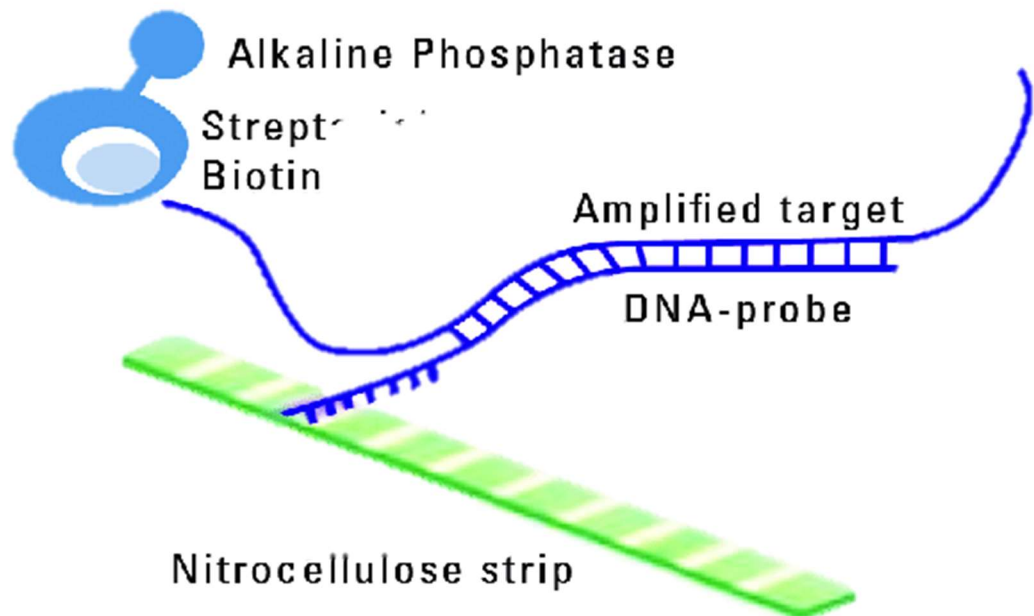


Figure 11. Hybridation inverse principe 3: après une étape de lavage qui élimine l'ADN non fixé aux sondes, il y a liaison de la streptavidine marquée par la phosphatase alcaline (conjuguée) à la biotine de l'hybride. (Pawlotsky, 2016)

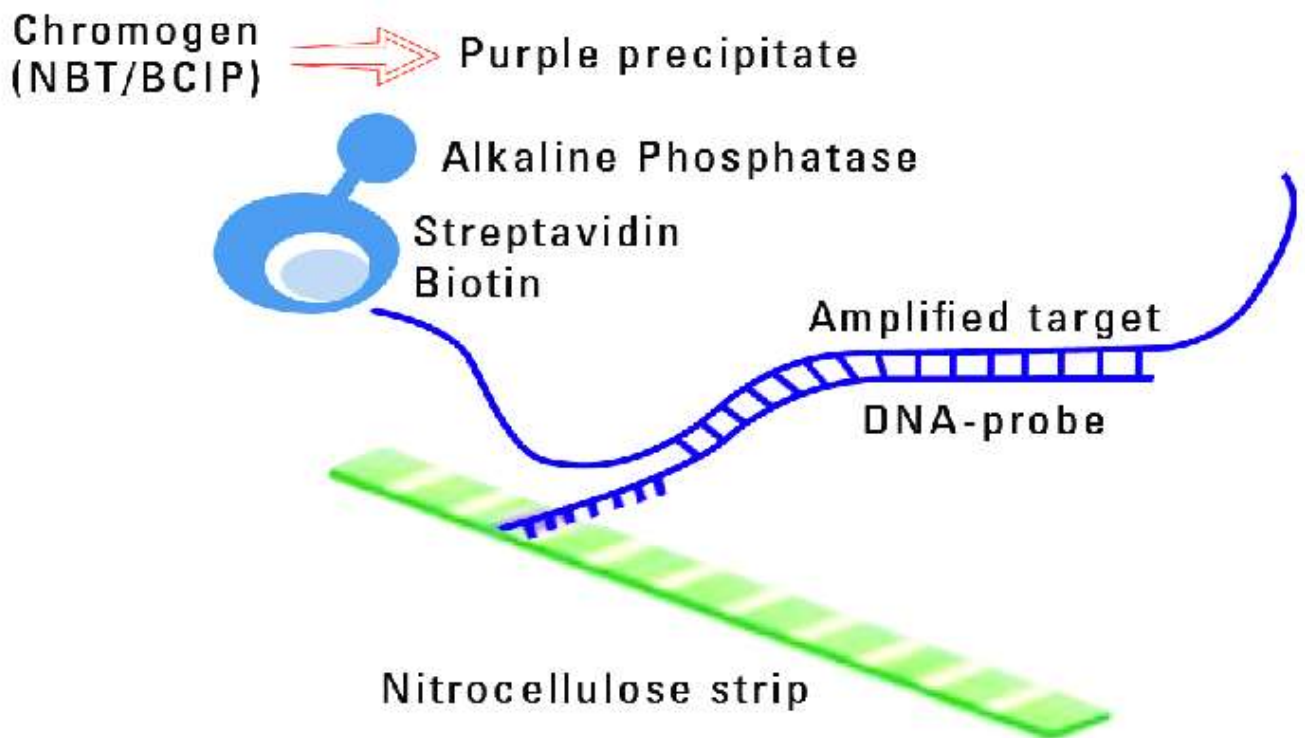


Figure 12. Hybridation inverse principe 4: après étape de lavage, on ajoute un chromogène BCIP/NBT (substrat) qui va réagir avec la phosphatase alcaline pour former un précipité de couleur violette/marron, qui entraîne la formation d'une série de bandes visibles sur la bandelette. (Pawlotsky,2016)

II.1.2. Lecture et interprétation

L'hybridation ADN-sonde est révélée par une réaction colorée sous forme de bandes. Chaque profil de bandes obtenu correspond à un type et/ou sous-type particulier du VHC.

II.1.2.1. Lecture

Après validation des contrôles, l'identification des bandes révélées se fait par comparaison à l'abaque (figure 13).

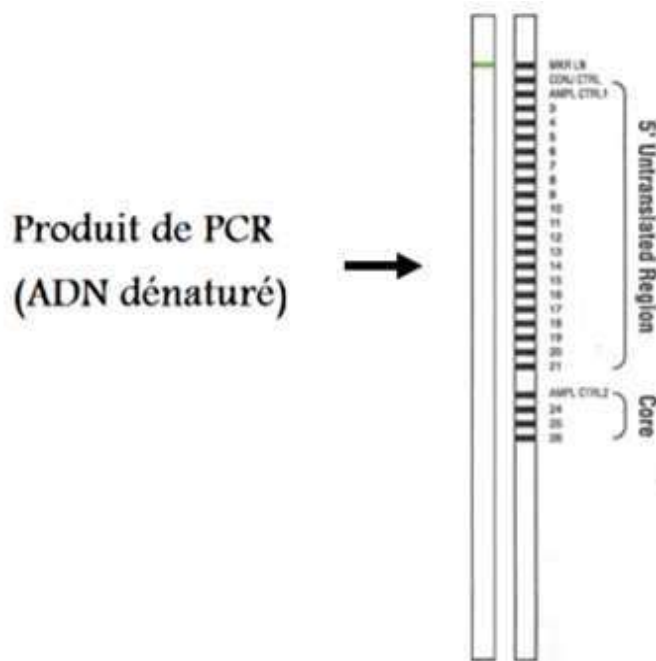


Figure 13. Lecture des bandes. (Pawlotsky,2016)

A droite l'abaque utilisé comme référence pour la lecture des résultats. A gauche la bandelette utilisée pour l'échantillon ou le témoin et sur laquelle sont fixées les sondes Oligo nucléotidiques spécifiques des différents génotypes VHC. En haut, la ligne de contrôle conjugué (CONJ CTRL) sert de contrôle à la réaction colorée.

Le contrôle d'amplification (AMPL CTRL 1) à la ligne 2 contient des sondes universelles qui s'hybrident au produit de PCR de la region 5'NC. Le contrôle d'amplification (AMPL CTRL 2) à la ligne 23 contient des sondes universelles qui s'hybrident au produit de PCR de la région C.

(les réactifs sont mentionnés dans la partie annexe.).

Ce test comporte trois étapes :

- Extraction de l'ARN viral par utilisation du kit «AMPLI COR HCV » QIA amp ® Viral RNA Mini Kit50
- Amplification génique (RT-PCR) par utilisation du kit « HCV Amplification 2.0 Kit (LiPA) » de SIEMENS
- Hybridation inverse par utilisation du Kit «HCV Genotype 2.0 Assay (LiPA) » de SIEMENS





Les étapes détaillées ainsi que réactifs utilisés sont détaillés en annexe.

Chapitre V
Résultats et discussion

1. Résultats

Génotypes obtenus

Tableau II. Ces profils correspondent selon le tableau fourni par le kit aux différents génotypes.

G1	
G2	
G3	
G4	

Nous allons présenter les résultats de l'analyse des 205 échantillons

1.1. Distribution globale de la charge virale selon le nombre de patients atteints

Tableau III. Distribution globale de la charge virale selon le nombre de patients atteints

Charge virale	Charge Virale Faible (<200,000 copies/mL)	Charge Virale Modérée (200,000-800,000 copies/mL)	Charge Virale Élevée (>800,000 copies/mL)
Le nombre de patients	42	103	60
-			
Pourcentage%	20.48	50.24	29.26

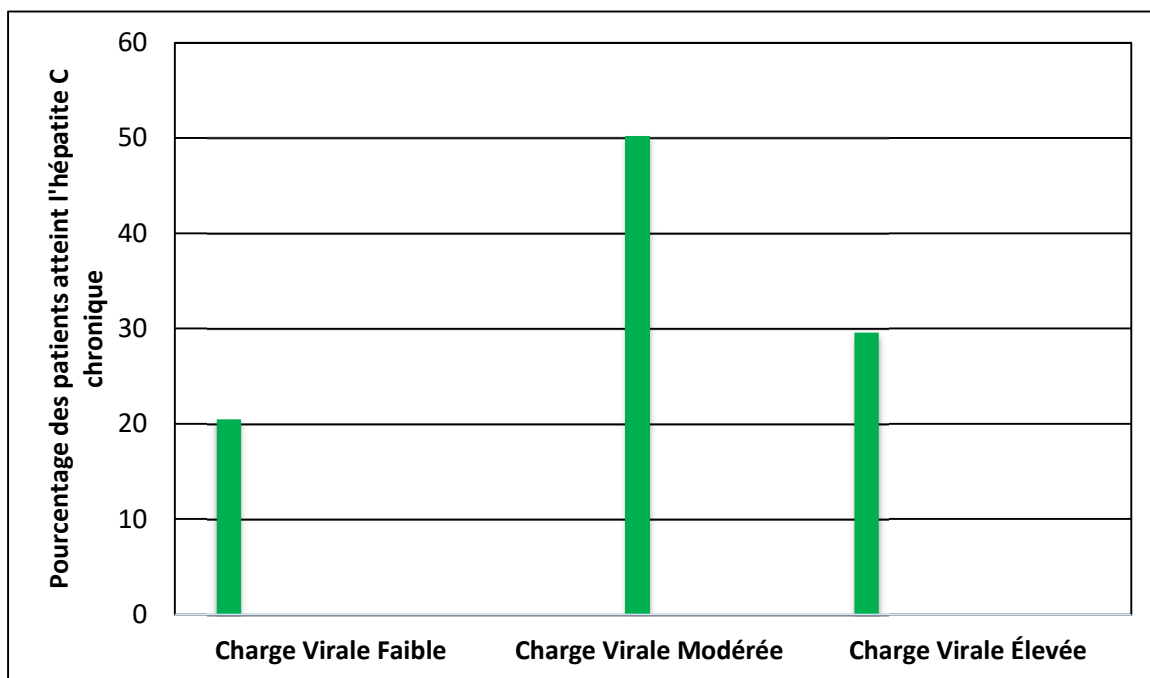


Figure n°14: Distribution globale de la charge virale selon le nombre de patients atteints

La majorité des patients atteints du VHC présente une charge virale modérée (50,24 %), suivie de ceux avec une charge virale élevée (29,26 %) et faible (20,48 %). Cette répartition met en évidence la nécessité d'un suivi régulier pour ajuster les traitements et prévenir les complications chez les patients avec une charge virale élevée.

1.2. Répartition des patients atteints d'hépatite C chronique selon le sexe (N=205) :

Les patients atteints d'hépatite C chronique, faisant l'objet de cette étude sont répartis en **116** sujets de sexe masculin, et **89** sujets de sexe féminin. Ces données sont illustrées dans le tableau suivant.

Tableau IV : Répartition des patients atteints d'hépatite C chronique selon le sexe (N=205)

Le sexe	Nombre des patients	Pourcentage %
Homme	116	43
Femme	89	57
Total	205	100

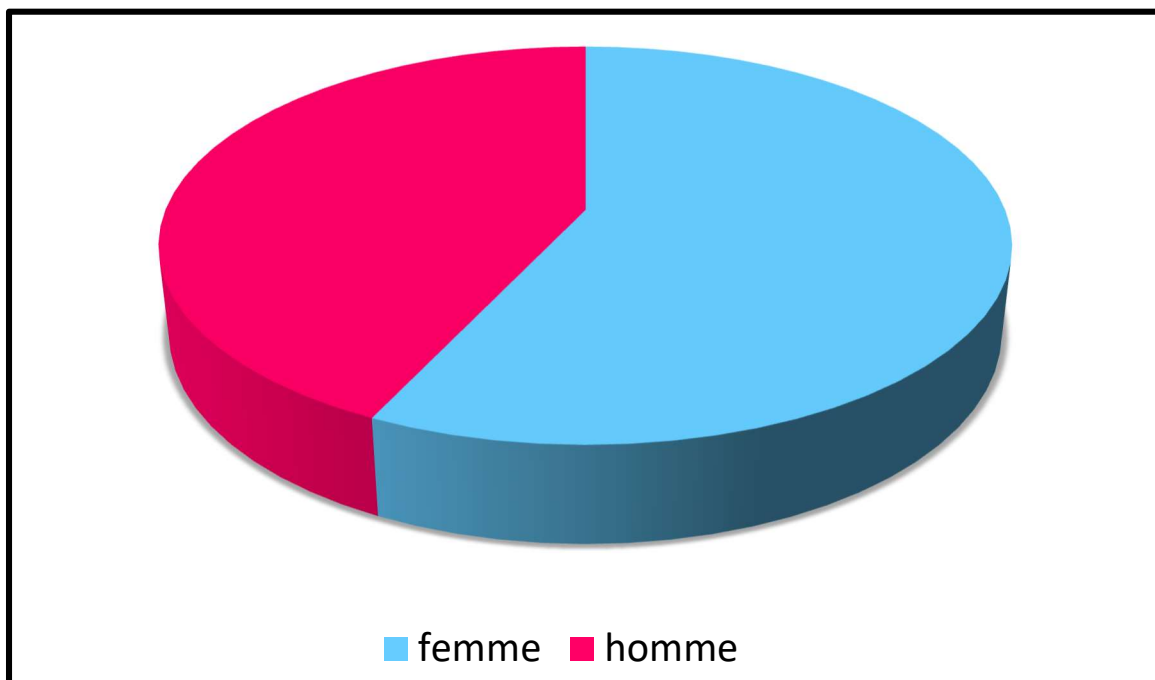


Figure n°15: Répartition des patients atteints d'hépatite C chronique selon le sexe Les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas de prédominance de sexe.

1.3. Répartition des patients atteints d'hépatite C chronique selon l'âge :

Tableau V : Répartition des patients atteints d'hépatite C chronique selon l'âge (N= 205)

Les tranches d'âge (2009-2016)	Nombre des patients	Pourcentage%
≤ 20	18	9
21 – 30	62	30
31 -40	35	17
41-50	17	8
≥51	73	36
Total	205	100

Pourcentage des patient atteits l'hépatite C chronique

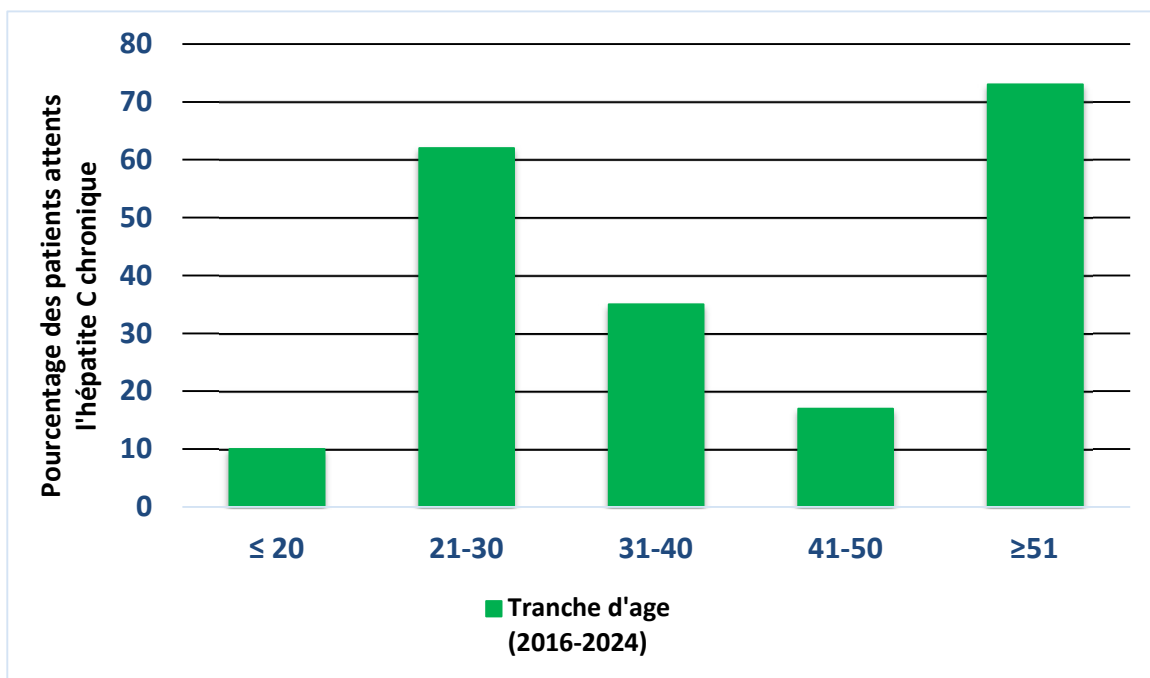


Figure n°16 : Répartition des patients atteints d'hépatite C chronique selon l'âge

Les résultats obtenus montrent que la tranche d'âge (≥51 ans) est la plus touchée avec un taux de 70 %.

1.4. Distribution globale des génotypes du VHC (N=205) :

Tableau VI : Distribution globale des génotypes du VHC

Génotype	G1	G2	G3	G4	Indéterminé	Total
Le nombre	138	25	20	15	7	205
Le pourcentage%	67	12	10	7	4	100

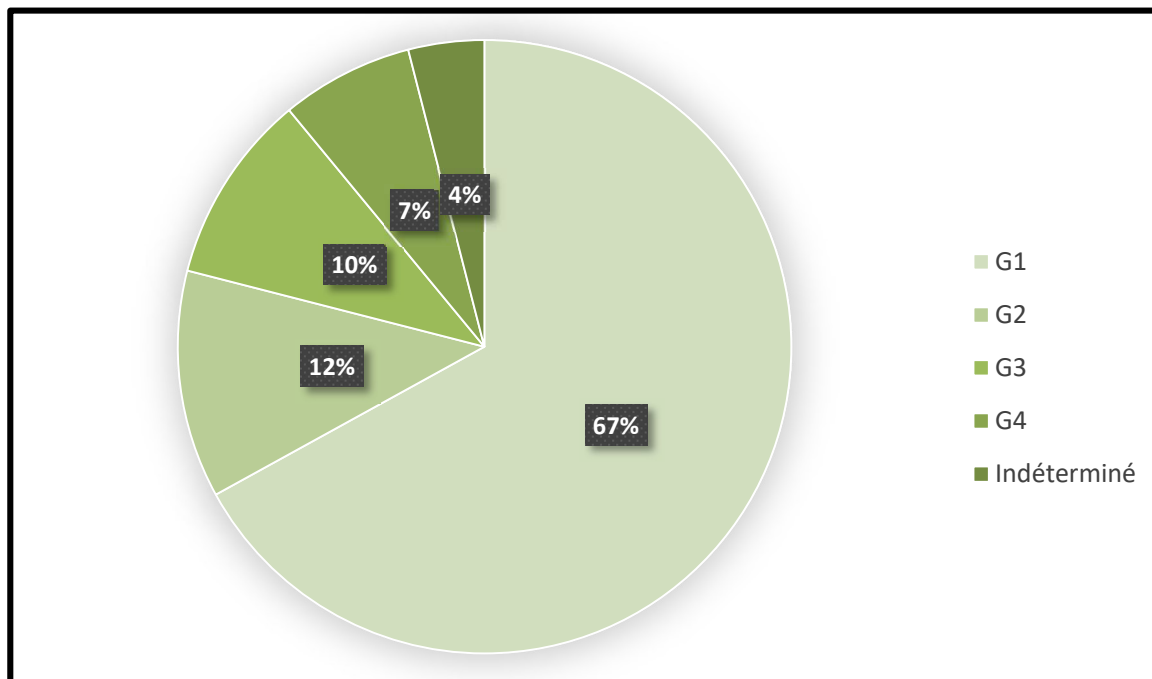


Figure n°17 : Répartition globale des génotypes du VHC

Parmi les échantillons analysés, tous les génotypes du VHC ont été identifiés à l'exception du génotype 5 et 6, avec une prédominance marquée du génotype 1, suivi des génotypes 2 et 3. Ainsi, les trois principaux génotypes observés en Algérie sont les G1, G2 et G3.

1.5. Comparaison des charges virales selon le génotype

Tableau VII : Comparaison des charges virales selon le génotype

	Nombre de Patients	Charge Virale Moyenne (UI/mL)	Charge Virale Médiane (copies/mL)	Charge Virale Min/Max (copies/mL)	Proportion de Patients avec Charge Virale Élevée (%)
G1	138	850.000	800.000	100.000/1500.000	67
G2	25	500.000	480.000	80.000/900.000	12
G3	20	350.000	320.000	50.000/700.000	9
G4	15	250.000	220.000	30.000/600.00	7

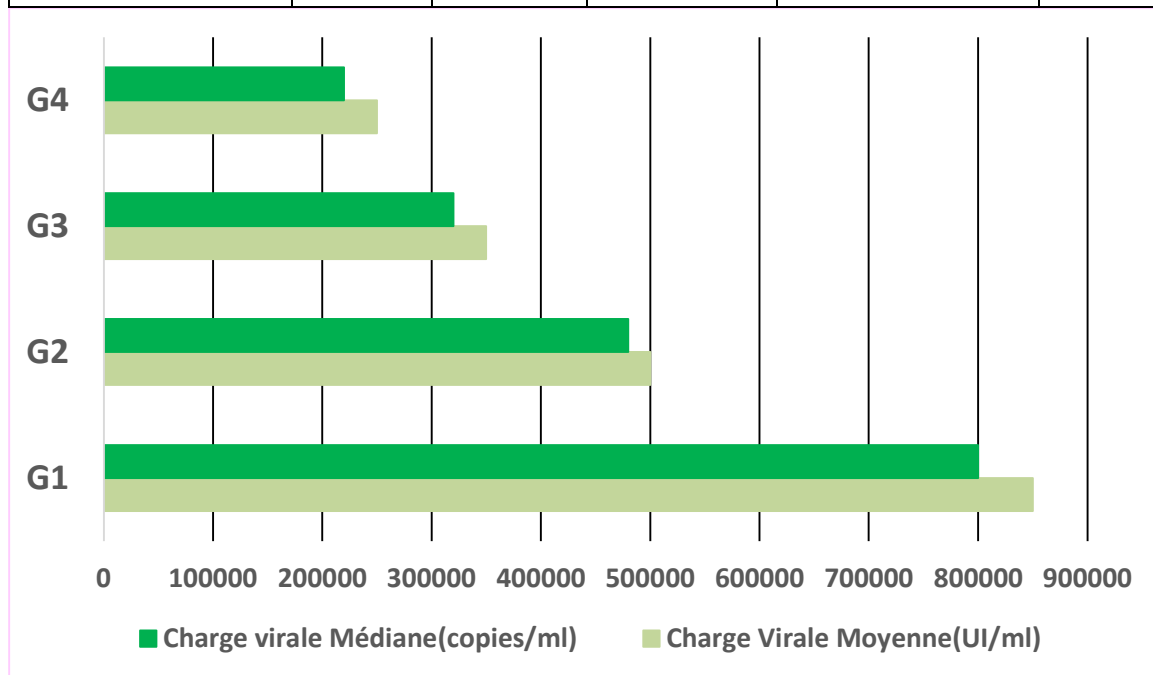


Figure n°18 : Comparaison des charges virales selon le génotype

Les génotypes du VHC montrent des différences marquées en termes de charge virale. Le génotype G1 est associé à des charges virales significativement plus élevées, suivi par le G2, tandis que les génotypes G3 et G4 affichent des charges virales plus faibles.

1.6. Distribution des génotypes du VHC selon le sexe :

Tableau VIII : Distribution des génotypes du VHC selon le sexe (N=205)

	Homme		Femme	
	n	%	n	%
Génotype 1	83	76	55	61.8
Génotype 2	8	7.33	17	19.10
Génotype 3	11	10.09	9	10.11
Génotype 4	7	6.42	8	8.9
Total	109	100	89	100

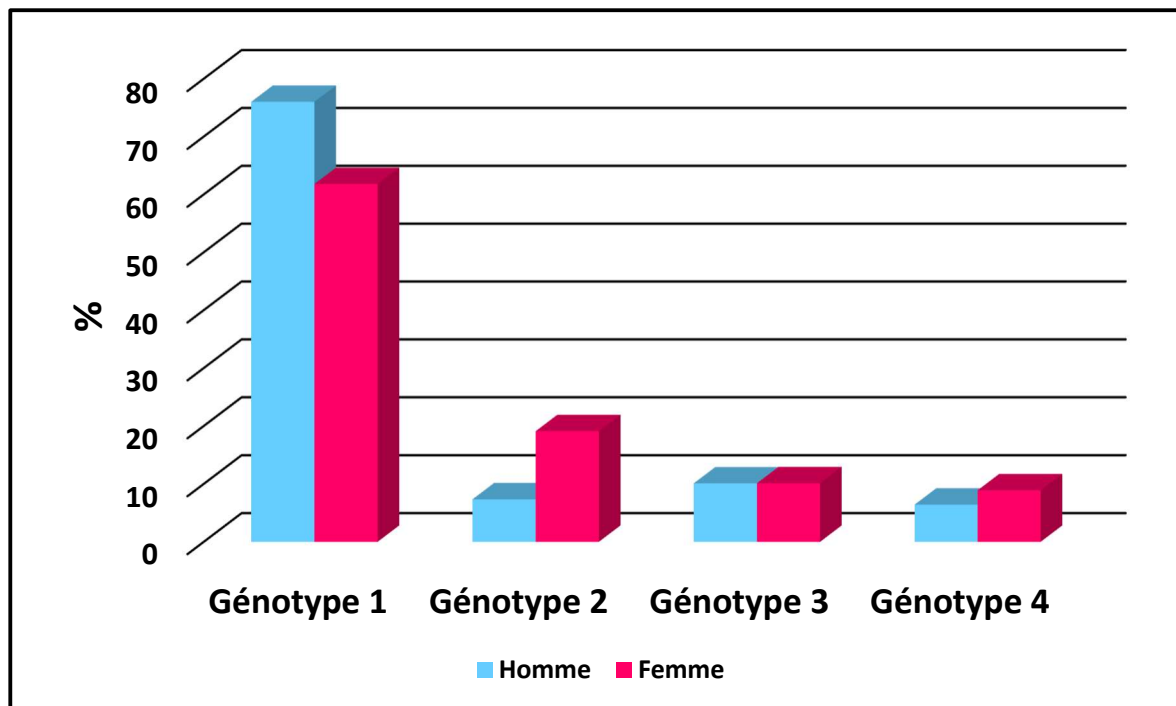


Figure n°19: Distribution des génotypes du VHC selon le sexe

Les résultats obtenus montrent que le sexe n'a pas d'influence sur la distribution des génotypes donc quel que soit le sexe le génotype 1 est prédominant.

1.7. Distribution des génotypes du VHC selon l'âge :

Tableau IX : Distribution des génotypes du VHC selon l'âge (N=205)

	< 51 ans		≥ 51 ans	
	N	%	N	%
G1	61	60	76	76
G2	10	9.80	14	14
G3	20	19.60	7	7
G4	11	10.78	3	3
Total	102	100	100	100

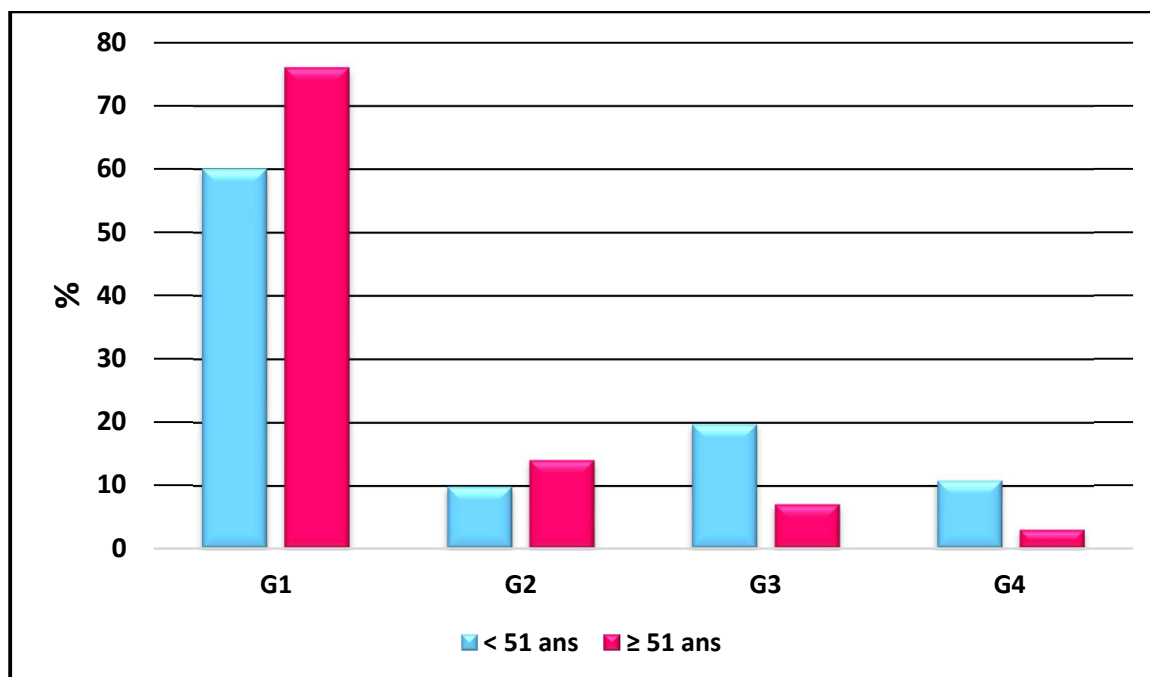


Figure n°20: Distribution des génotypes selon l'âge

Les génotypes (1 à 4) sont les plus fréquents chez la tranche d'âge supérieur ou égale à 51 ans.

1.8. Distribution géographique des différents génotypes en Algérie (N=205)

Les **205** patients atteints d'infection chronique par le VHC sont originaires :

69,49% des wilayas de centre (Alger, Boumerdes, Média, Bouira, Tiziouzou, Tipaza).

18, 3% des wilayas de l'est (Batna, Bejaia, Khenchla, Sétif, Mila, Tébessa ,Djидjel) .

6,36% de l'ouest de pays (Chlef, Khemismiliana, Ain defla, Oran, sidi belabbes, Mascara ,Media) .

5 ,57% du sud de pays et des hauts plateaux (Djelfa, Boussada, Laghouat, Bechar, Hassi Messaoud ,Tamanrasset).

Tableau X : Répartition géographique des différents génotypes en Algérie : (N=205)

		Centre nombre	%	Est nombre	%	Ouest nombre	%	Sud nombre	%
G1		60	75	30	51.72	28	56	10	100
G2		7	12.5	13	25.86	9	18	0	0
G3		10	8.75	15	22.41	10	20	0	0
G4		3	3.75	0	0	3	6	0	0
Total		80	100	58	100	50	100	10	100

Nos patients sont originaires pour la plupart, de la région centre du pays. Au niveau de celle-ci, on constate la prédominance du G1 suivi du G3, puis des G2, G4, situation comparable à celle qu'on retrouve dans de nombreuses régions du monde, par contre aucun G5 et G6 n'a été dépisté.

Cette constatation est à confirmer avec un échantillon plus représentatif.

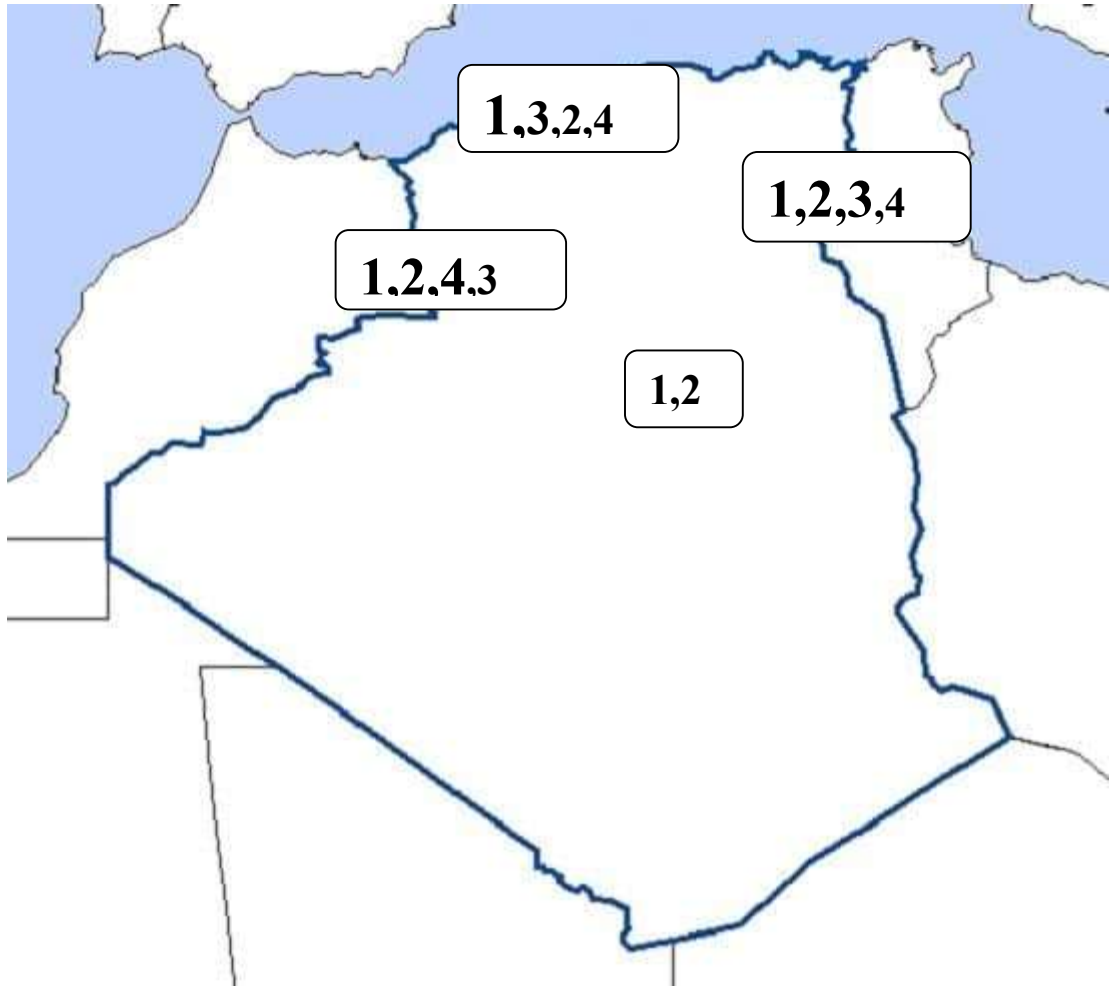


Figure n°21: Les différents génotypes du VHC retrouvés en Algérie

1.9. Les différents sous-types génomiques du VHC retrouvés en Algérie : (identifiés par hybridation inverse) :

Tableau XI : Les sous-types génomiques du VHC retrouvés en Algérie (N=205)

Sous types	Nombre de patient	Pourcentage %
G1a	50	24.39
G1b	88	42.92
G2	25	12.19
G3a	20	9.75
G4	10	4.87
G4e	3	1.46
G4f	2	0.97
Indéterminé	7	3.41
Total	205	100

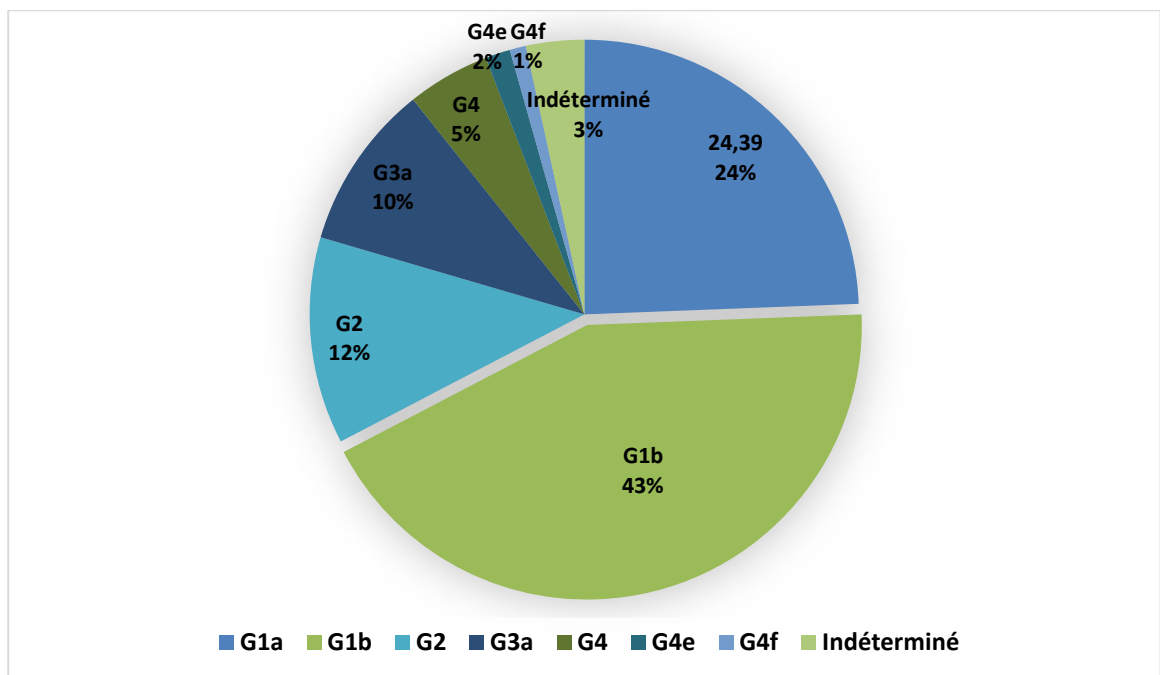


Figure n°22: Les différents sous-types génomiques du VHC retrouvés en Algérie

On note la large prédominance du sous type 1b par rapport au sous type 1a en Algérie.

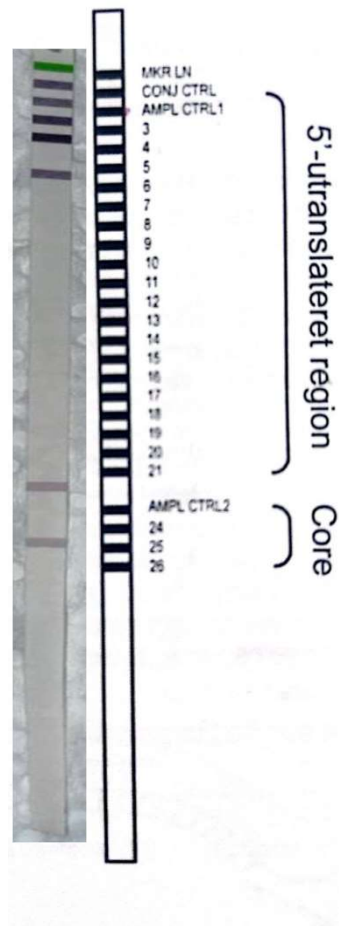


Figure n°23 : Ce profil correspond selon le tableau fourni par le kit au génotype 1b.

1.10. Distribution annuelle des différents géotypes du VHC de l'année 2016 à l'année 2024 (N=205) :

Tableau XII : Distribution annuelle des différents géotypes du VHC de l'année 2016 à l'année 2024.

Géotype Année	G1		G2		G3		G4		Total
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Jun 2016	18	66.66	6	22.22	2	7.40	1	3.70	27
2017	29	61.70	9	19.14	5	10.63	4	8.51	47
2018	64	77.10	5	6.02	8	9.63	6	7.22	83
2019	8	61.53	1	7.69	3	23.07	1	7.69	13
2023	6	50	0	0	6	50	0	0	12
2024	7	43.75	4	25	5	31.25	0	0	16

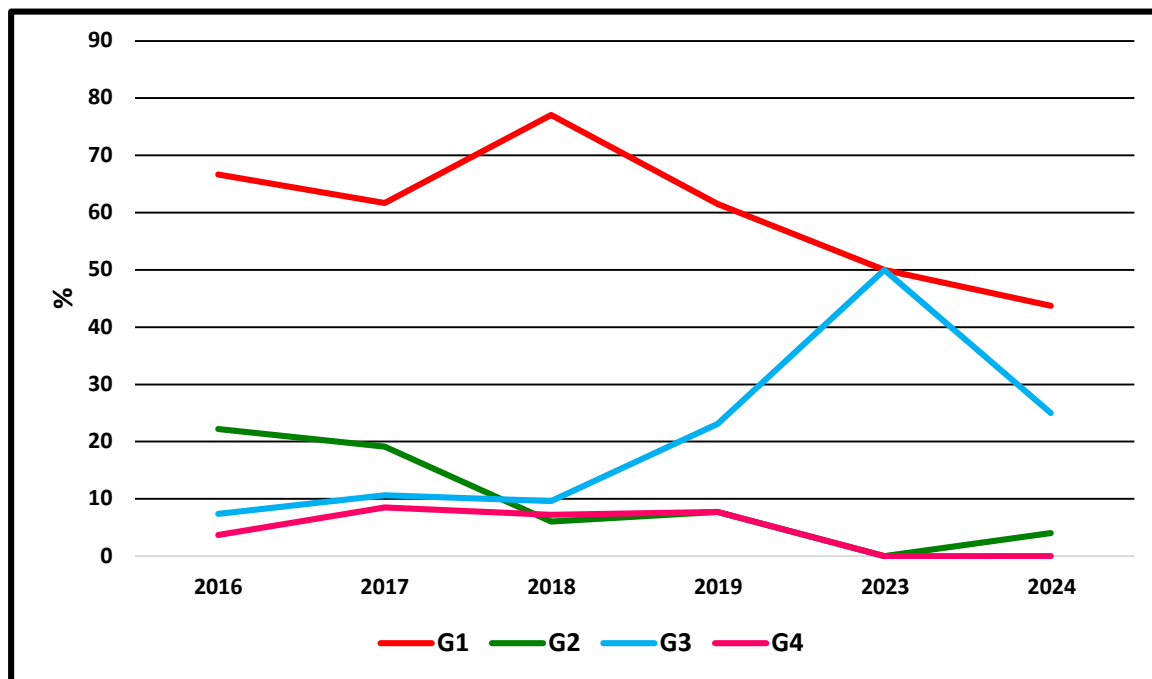


Figure n°24: Distribution annuelle des différents géotypes du VHC de l'année 2016 à 2024

Le géotype G1, dominant au départ, diminue progressivement après un pic en 2018, tandis que le géotype G3 connaît une hausse notable en 2023 avant de baisser en 2024. Les géotypes G2 et G4 restent plus stables avec de légères variations.

Ces fluctuations suggèrent des influences épidémiologiques ou des réponses aux interventions, tout en montrant une tendance globale cohérente.

Discussion :

Notre étude révèle que la prévalence de l'infection par le VHC augmente avec l'âge, en particulier chez les individus âgés d'une cinquantaine d'années. En effet, dans notre échantillon, la tranche d'âge la plus affectée est celle des personnes de plus de 50 ans, représentant 70 % des cas.

En outre, les résultats de notre travail laissent suspecter que Les génotypes du VHC montrent que le génotype G1 associé à des charges virales plus élevées, est présent dans **67 %** des cas.

Génotype 2 présent dans **12 %** des cas.

D'autre part, les génotypes G3 et G4 semblent se répliquer à des taux plus bas, ce qui se traduit par une charge virale plus faible, est présent dans 9% des cas.

On note des variations géographiques dans la distribution des génotypes du virus de l'hépatite C.

On constate dans notre échantillon, la nette prédominance du G1b, suivi des autres types : 1a, 2, 3a, 4, 4e et 4f , par contre aucun G5 et G6 n'a été dépisté. Cette répartition est comparable à celle qu'on retrouve dans de nombreuses régions du monde. (**Messina et al,2015**)

En Europe de l'Ouest, les génotypes les plus couramment observés sont le 1b, le 3a, le 1a, et le 2. Le génotype 1b est particulièrement répandu dans le sud de l'Europe. En France, il est le plus fréquent avec une prévalence de 41 %, suivi par le génotype 3a (22 %), le 1a (16 %), et le 2 (11 %). Les génotypes 4 (4 %), ainsi que les génotypes 5 et 6 (1 %), sont beaucoup plus rares. Le génotype **1b** est plus fréquemment détecté chez les femmes de **plus de 50 ans** et chez les patients ayant des antécédents de transfusion sanguine, tandis que le génotype 3a est davantage associé aux personnes ayant un historique de toxicomanie.

En Afrique, **G4** est fréquemment observé en Afrique de l'Est (particulièrement en Égypte). En Libye, ce sont G1 et G 4 qui sont les plus fréquents.

Les avancées récentes dans le traitement de l'hépatite C, notamment avec l'introduction des antiviraux à action directe (AAD), ont radicalement transformé les stratégies thérapeutiques. Ces nouveaux traitements ont montré une efficacité accrue, même chez les patients porteurs des génotypes les plus résistants, comme le **1b**. Des études supplémentaires sont nécessaires pour évaluer l'impact de ces thérapies sur la population locale et pour mieux comprendre l'évolution des génotypes dans le temps, particulièrement en réponse aux nouveaux traitements.

Nos résultats concordent surtout avec ceux de nos voisins tunisiens. En effet selon Debbeche, il a été montré une prédominance du G1 : 1b (79%) et 1a (5 %), suivi par les G2 (10 %), 3a (3 %) et 4a (1 %). Les génotypes 5 et 6 n'ont pas été retrouvés. (**Debbeche,2013**)

La répartition des génotypes du VHC montre une nette prédominance du génotype 1 dans toutes

les régions du pays. Ce génotype est lié à une moins bonne réponse au traitement antiviral classique, contrairement aux génotypes 2 et 3, qui affichent un taux de réponse favorable estimé à environ 80 % **(Pawlotsky,2016)**.

La prédominance du **G1b** : 59,68% par rapport au G1a : 14,32% est un avantage dans le cas de l'utilisation de traitement sans interféron car le sous type 1a nécessite l'ajout de ribavirine.

Actuellement le typage du VHC se fait en routine essentiellement par deux tests : hybridation inverse et PCR en temps réel.

Par ailleurs, la fréquence du G3a est estimée à 9,41%, elle est particulièrement élevée dans la région centre du pays avec un taux de 13%. Certaines nouvelles molécules sont moins efficaces chez les patients infectés par le G3 et requièrent un plus long schéma thérapeutique **(Andonov et al ,2014)** **(Dhumeaux et al,2008)** **(Pawlotsky,2016)**. Tous les génotypes sont retrouvés sauf les génotypes 5 et 6.

Conclusion :

En conclusion, bien que les traitements pan-génotypiques aient considérablement simplifié la prise en charge de l'hépatite C, le génotypage reste un outil essentiel. Il permet de personnaliser les traitements, d'identifier des variations virales, d'évaluer les risques de résistance, et de contribuer à la surveillance épidémiologique. Cette approche offre une gestion plus précise et individualisée de l'infection par le VHC.

Le génotype **1 (1b)**, prédominant dans notre échantillon et le plus fréquent en Algérie, est heureusement devenu très réceptif aux nouveaux traitements. Ce génotype est suivi par le génotype 3, principalement présent dans le centre du pays, et le génotype 2 dans d'autres régions

Références bibliographiques

1. Amaury, M., 2007. Développement de nouvelles approches antivirales du virus de l'hépatite C basées sur l'utilisation d'interférons alpha variants et d'antisens de type Peptide Nucleic Acids. Immunologie, Université Claude Bernard - Lyon I, p24-211.
2. Andonov A., Lin L., Mc Guinness L., Krajdén M., 2014. Répartition des géotypes du virus de l'hépatite C parmi les nouveaux cas d'infection par le virus de l'hépatite C en Colombie-Britannique (2000-2013) -Relevé des maladies transmissibles au Canada (RMTC), vol 40-19.
3. Armstrong, G.L., Wasley A., Simard E. P. et al, (2006). The Prevalence of Hepatitis 1999 through 2002. *Ann Intern Med.*, 144 :705-714.
4. Ashfaq, U. A., Javed T. et al., 2011. An overview of HCV Molecular biology, replication and immune response. *Virology journal* N, vol. 8, n°161, p. 1-10.
5. Asselah, T., Martinot M., Boyer et Marcellin P., 2000 Variabilité génétique du virus de l'hépatite C : implications cliniques. Edition : Masson, Paris, vol 24, N° 2, p. 175.
6. Barten Schlager R., Lohmann V., 2000. Replication of hepatitis C virus, 81:131-1648.
7. Bihl, F, and F. Negro. (2009). Chronic hepatitis E in the immune suppressed: a new source of trouble? *Journal of Hepatology.* 50:435-437.
8. Chavaliez S., Pawlotsky J.M., 2007. Hepatitis C virus: Virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *World J Gastro enterol* ; 13(17) : 2461-2466.
9. Debbeche R., Said Y., Ben Temime H., El Jery K., Bouzaïdi S., Salem M., Najjar T., 2013. Epidémiologie de l'hépatite C en Tunisie. *La Tunisie Médicale*, vol 91 (n°02) : 86-91.
10. Dhumeaux D et l'égide de l'ANRS et de l'AFEF. 2008. Prise en charge des personnes infectées par les virus de l'hépatite B ou de l'hépatite C –Rapport de recommandation - Éditions EDK/Groupe EDP Sciences.
11. Donald, G., Murphy, à Erwin Sablon., b Jasmine Chamberland. et al., 1992. Hepatitis C Virus Genotype 7, a New Genotype Originating from Central Africa. *Journal of clinical microbiologie.* Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Québec, Canada, vol 53 Number 3. Evelyne, M, 2007. Les virus. Edition : le cavalier Bleu, 96p.
12. Gaudy, C, Goudeau A, 2005. La diversité du virus de l'hépatite C : méthodes d'étude, implication dans la pathogenèse et la résistance au traitement. Université François Rabelais, Cedex 1, vol 9, n°5, p 343-55.

13. Guévin, C., 2012. Développement d'un modèle murin permettant la réplication du virus de l'hépatite C in vivo et étude sur l'autophagie. Université du Québec INRS-Institut Armand-Frappier. P 9- 210.
14. -Henquell, C, Abergel A., Bailly J-L., Peigue-Lafeuille H., 2011. Le virus de l'hépatite C de génotype 5 : un virus rare, une histoire épidémiologique méconnue. *Virologie*. John Libbey EURO TEXT. Paris, n°5, p 286-95
15. Khelifa, R, 2008. Distribution des génotypes de l'hépatite C en Algérie : Expérience de l'hôpital Mustapha
16. Lavanchy D, Izopet J., 2011. Recombinaison génétique et virus de l'hépatite C, *Virologie*, 12 (1) : 7-14.
17. Le Guillou-Guillemette H, *et al.* Virus de l'hépatite C, aspects virologiques. *Actuel Pharm.* 2019 ;58(582) :23-6.
18. Legrand-Abravanel F, Izopet J., 2008. Recombinaison génétique et virus de l'hépatite C, *Virologie*, 12 (1) : 7-14.
19. Leroy, Q. T et. Nguyen P, Cocco S., Nouyou M., Ferreira .and Deny P., 2016. Large-scale lysis of hepatitis C virus serological typing assay: effectiveness and limits. *J. Med. Virol.* 55 :18-23.
20. Lewis, S.H, Dirksen S. *et al.*, 2011. Soins infirmiers Tome 3. Edition française. Canada
21. Messina, J. P., Humphreys, I., Flaxman, A., Brown, A., Cooke, G. S., Pybus, O. G., & Barnes, E. (2015). *Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes*. *Hepatology*, 61(1), 77-87.
22. Ogata N, Alter H. J., Miller R.H., Purcell R.H. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Nat Acad. SCI USA* 1991, 188 : 3392-6.
23. Okamoto H., Kojima M., Okada S. *et al.*, 1992. Genetic drift of hepatitis C virus during an 8.2-year infection in a chimpanzee : variability and stability. *Virology*; 190: 894-9.
24. Pawlotsky J.M ., Aghemo G.A ., Back D ., Dusheiko D ., Forns X., Puoti M., Sarrazin CH., 2015. Recommandations de l'EASL sur le traitement de l'hépatite C 2016 . *Journal of Hepatology* , vol. 63 199-236
25. Payne , E, Totten S. *et al.*, 2014. Surveillance de l'hépatite C au Canada, 40-19.
26. Penin, F, Dubuisson J. *et al.*, 2004. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology*, vol. 39, n°1, p. 5-19.
27. Pol, Set Fontaine, H, 1998. Hépatites virales. e4-310 - C -10 *Pédiatrie.*, 4-310 .
28. Schvoerer, E, Thumann C, Abraham J.D., Stoll-Keller F., 2003. Le virus de l'hépatite

Cet les cellules du système immunitaire. Virologie. John Libbey EUROTEXT. Université Louis Pasteur, Strasbourg, vol 7 n°5, p.339-51.

29. Shepard C.W., Finelli L. et al., 2005. Global epidemiology of hepatitis C virus infection, vol. 5, n°9, p 558-567.
30. Simmonds P., J. Bukh. et al., 2005. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. Hépatologie, vol. 42, n°4, p.962-973.
31. Vricinb, H., Poel, CL., Reesink, HW, 1995. Look - back study of infectivity of suit-HCV ELISA positive blood components. Lancet., 345 : 95-96.
32. Zeba, T.A.M, 2009. Coïnfection du virus de l'hépatite C (VHC) et du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) chez les femmes enceintes au centre médical Saint-Camille de Ouagadougou. Université de Ouagadougou : Unité de Formation et de Recherche Sciences de la Vie et de la Terre 60 p.

Glossaire

La cirrhose : est une maladie grave du foie, résultant d'agressions biochimiques répétées, le plus souvent par la consommation chronique d'alcool ou par des virus hépatotropes mais pouvant aussi résulter de l'accumulation de graisses dans le foie, de maladies auto-immunes, de déficits enzymatiques ou autres

Le **carcinome hépatocellulaire** : (généralement désigné par l'abréviation **CHC**) est un cancer "primitif" du foie, cancer qui se développe à partir des cellules du foie

Nitrocellulose : NITRO-CELLULOSE, subst. fém. CHIM. Ester nitrique de la cellulose, obtenu par l'action d'un mélange d'acide nitrique et d'acide sulfurique sur la cellulose à l'état de coton ou de pâte à papier, utilisé comme explosif ou comme support de film.

La toxicomanie : est une consommation abusive de substances, par exemple l'alcool, le tabac, les amphétamines, la caféine, le cannabis, la cocaïne, l'ecstasy, l'héroïne, les hallucinogènes, le LSD, la méthadone, etc., ou une dépendance physique ou psychologique à ces substances.

Annexe

Génotypage du VHC par technique d'hybridation inverse

A/Extraction de l'ARN viral par utilisation du kit «AMP LICOR HCV»QIA amp® Viral RNA

Mini Kit50:

❖ Réactifs fournis dans le kit:

- Buffer AW1, wash buffer 1(19ml concentrate).
- Buffer Aw2 ,wash buffer 2(13ml concentrate).
- Buffer AVL Viral lysis buffer (31ml).
- Buffer AVE Elution buffer (2.0ml).
- Carrier RNA(310µg).
- Tubes de 2ml.
- QiAamp Mini Spin column.

- Ethanol96–100°

❖ Réactifs à préparer:

- Vérifier l'absence de précipité dans le tampon AVL, incuber à 80° si nécessaire.
- Diluer le «**carrier-ARN-tampon AVE** » (aliquote congelé à 20°) dans le tampon AVL en fonction du nombre d'échantillon à extraire (Mélanger par retournement 10 fois, ne pas vortexer).

❖ Matériels requis :

- Hotte à flux laminaire.
- Micropipettes réglables à différents volumes.
- Embouts à filtre (1ml, 200µl,50µl,20µl).
- Eppendorf de1,5ml ou 2ml.
- Micro centrifugeuse à 16000Xg.

- Vortex.
- Minuterie.
- Gants sans talc.

❖ Procédure:

- 1- Mettre **560 µL** de tampon AVL-**CarrierRNA** dans un Eppendorf de 1.5ml.
- 2- Ajouter **140 µl** de l'échantillon à traité.

- Vortexer pendant 15 secondes.

3- Incuber à température ambiante pendant **10 minutes.**

4- Centrifuger brièvement.

5- Ajouter **560 µl** d'Ethanol.

- Vortexer pendant **15 secondes.**

- Centrifuger brièvement.

6- Appliquer soigneusement **630 µl** du mélange de l'étape **5** à la colonne QIA Amp Mini (placée dans un tube collecteur de 2 ml) sans mouiller les bords et sans toucher le filtre avec l'embout . Bien fermer le bouchon pour éviter la contamination croisée pendant la centrifugation.

- Centrifuger à 6000g pendant 1 min.

- Placer la colonne dans un tube collecteur propre de 2 ml et jeter le tube contenant le filtrat. Si la solution n'est pas entièrement passée à travers la membrane centrifuger encore une fois.

7- Ouvrir la colonne avec précaution et répéter l'étape **6.**

8- Ouvrir la colonne avec précaution et ajouter **500 µl** du tampon **AW1.**

- Fermer et centrifuger à 6000g pendant 1min.

- Placer la colonne dans un tube collecteur propre de 2 ml et jeter le tube contenant le filtrat.

9- Ouvrir la colonne avec précaution et ajouter **500 µl** du tampon **AW2.**

- Fermer et centrifuger à 20000 g pendant 3min.

10- Placer la colonne dans un Eppendorf de 1.5 et jeter le tube contenant le filtrat.

- Centrifuger à 20000 g pendant 1min.

11- Placer la colonne dans un Eppendorf de 1.5 et jeter le tube contenant le filtrat.

- Ouvrir la colonne avec précaution et ajouter **60µl** du tampon **AVE.**

- Fermer et incuber à température ambiante pendant **1min.**

- Centrifuger à 6000g pendant 1min.

- Récupérer l'Eppendorf contenant l'éluât et le conserver à -20° ou -80°

B/ Amplification génique (RT-PCR) par utilisation du kit « HCVAmplification2.0 Kit (LiPA) » de SIEMENS:

❖ Réactifs fournis dans le kit:

La trousse contient les réactifs en quantité suffisante pour amplifier l'ARN de 40 échantillons ou contrôles.

- ENZ MIX : contient les transcriptases inverses Sensiscript et Omniscript ,la polymérase Hot Star Taq et l'uracile-N-glycosylase. A conserver entre -25° et -15°C.

- AMP MIX: contient les oligo nucléotides de synthèse dans un tampon avec le cocktail de dNTP/dUTP et MgCl₂. A conserver entre -25° et -15°C.

❖ **Matériel requis :**

- Hotte à ADN.
- Thermocycleur.
- Tubes Ependorff 1.5-2 ml.
- Vortex.
- Micropipettes à différents volumes.
- Tube de PCR de 0.2ml et portoirs.
- Embouts à filtre.
- Gants sans talc.
- Congélateur à -20°C.
- Glace.

❖ **Précautions avant la réalisation de la RT PCR:**

- a. Vérifier que le thermocycleur est calibré avant l'emploi.
- b. Ne pas amener l'ENZ MIX à température ambiante le sortir du congélateur juste avant l'emploi et le remettre immédiatement après.
- c. Amener l'AMP MIX à température ambiante environ 30 minutes avant l'emploi et le remettre au congélateur immédiatement après.
- d. Conserver les réactifs sur la glace en préparant la solution-mère de mélange réactionnel de RT-PCR.

❖ **Procédure :**

1- Préparer la solution mère de mélange réactionnel de RT-PCR(ENZMIX+AMPMIX) dans un tube Ependorff .

- Faire sortir l'ENZ MIX du congélateur et le mettre immédiatement dans de la glace.
- Pour amplifier un échantillon, mélanger 4 µl d'ENZ MIX avec 26 µl d'AMP MIX, pour x échantillons, il faut 4 x µl d'ENZ MIX et 26 x µl d'AMP MIX (Prévoir toujours un volume supplémentaire). Spinner l'ENZ puis le remettre au congélateur immédiatement.
- Mélanger brièvement en aspirant puis en rejetant le liquide avec la micropipette.
- Vortexer brièvement.

2- Mettre 30 µl de la solution mère de mélange réactionnel, obtenue ci-dessus, à chaque tube de réaction (tube PCR).

3- Vortexer l'ARN extrait, puis ajouter 20 µl à chaque tube de réaction (contenant déjà 30 µl de la solution mère de mélange réactionnel).

4- Placer les tubes à température ambiante pendant 10+/- 1 minutes avant amplification pour

permettre la dégradation de tout ADN contaminant.

5- mettre les tubes PCR dans le thermocycleur en utilisant le profil thermique suivant, avec la vitesse de montée par rampe en mode max :

ETAPE	Température	Durée
a-Transcription inverse	50 +/-0.5°C	30 minutes
b- étape initiale d'activation de la PCR	95 +/-0.5°C	15 minutes
c-dénaturation	95 +/-0.5°C	30 secondes
d- hybridation	50 +/-0.5°C	30 secondes
e- extension	72 +/-0.5°C	15 secondes
f- répéter les étapes c à e 39 fois (40 cycles au total)		
g-extension/élongation finales	72 +/-0.5°C	2 minutes
h-maintien	4 +/-0.5°C	A utiliser dans les 2 heures ou conserver immédiatement à -20 +/- 5 °C.

6-Enlever les tubes du thermocycleur et conserver les amplicons à -20 +/- 5 °C ou procéder immédiatement au test de génotypage.

Bien entendu, pour toute analyse PCR, il faut prendre les précautions appropriées pour éviter les contaminations croisées.

C- Hybridation inverse par utilisation du Kit «HCV Genotype 2.0 Assay (LiPA) » de SIEMENS :

❖ Matériel requis :

- Bain-marie avec plate-forme d'agitation (température et nombre de tours mn réglables).
- Agitateur oscillant ayant un angle inférieure ou égale à 13°.
- Dispositif d'aspiration.
- Minuterie.
- Micropipettes réglables (de 1 µl à 20 µl à 200 µl et 200 µl à 1000 µl).
- Multi pipette.
- Pointes.
- Eprouvette graduée (100ml).
- Tubes de 10 ml et de 20 ml.
- Eau distillée ou désionisée. A21.

- Gants.
- Pincés.
- Crayon.
- Papier absorbant.

La procédure du test comporte quatre étapes principales :

- a- Dénaturation des échantillons
- b- Hybridation proprement dite
- c- Lavage des bandelettes.
- d- Réaction colorée

a- Dénaturation des échantillons :

- Equilibrer la température du bain marie à agitation à 50 +OU – à 0.5 °C ; et régler le bain marie à 72 tr/mn.
- Vérifier que l'eau du bain marie recouvre le 1/3 inferieur d'une barquette témoin.
- Sortir les bandelettes (avec des pinces) et la DENAT SOLN, les laisser à température ambiante 35 minutes (sur une surface propre).
- Placer la HYB/SW SOLN dans le bain marie (de 37 à 50°C) environ 35minutes jusqu'à dissolution de tous les cristaux.
- Ecrire au crayon à papier un numéro d'identification au-dessus de la ligne de repère verte de chaque bandelette.
- Inclure une bandelette pour le contrôle négatif.
- Pour chaque bandelette, placer une barquette dans le plateau.
- Déposer 10µl de DENAT SOLN dans le coin supérieur de chaque barquette et refermer le flacon rapidement.
- Ajouter 10µl d'échantillon (le produit d'amplification par RT-PCR) ou de contrôle dans chaque barquette. Mélanger soigneusement en aspirant puis en rejetant le liquide avec la micropipette.
- Laisser la dénaturation s'effectuer à température ambiante pendant 5 minutes.

b-Hybridation des échantillons :

- 1- Ajouter 2ml de HYB/SOLN dans barquette.
- 2- Faire osciller délicatement la barquette pour mélanger les réactifs.
- 3- Immerger chaque bandelette marquée avec la ligne de repère orientée vers le haut dans la barquette correspondante.
- 4- Placer le plateau contenant les barquettes dans le bain marie à agitation, à 50 + ou – 0.5 °C et à 72 tr/mn.
- 5- Incuber le plateau pendant 60 + ou – 2 minutes et vérifier que chaque bandelette demeure complètement immergée et peut se déplacer librement.
- 6- 10 minutes avant la fin de l'incubation, ramener à température ambiante le RINSE SOLN 5X, le CONJ 100X et son diluant ainsi que le SUBS BCIP/NBT 100X et son SUBS BUF.
- 7- A la fin de l'incubation en lever le plateau du bain marie.

c- Lavage des bandelettes :

Maintenir le plateau selon un petit angle afin que le liquide s'accumule à l'extrémité d'une barquette, au-dessus de la ligne de repère de la bandelette, pour faciliter l'aspiration.

- 1- Aspirer la solution de la barquette à l'aide d'une pipette raccordée à un système d'aspiration.
- 2- Ajouter 2 ml d'HYBR / S W SOLN dans chaque barquette.
- 3- Osciller le plateau pendant 60 secondes à température ambiante.
- 4- Aspirer la solution.
- 5- Répéter le lavage (étape 2 à 4).
- 6- Ajouter 2ml d'HYB/SW SOLN dans chaque barquette et placer le plateau dans le bain marie à agitation, réglé à 50 ± 0.5 °C et à 72 tr/mn.
- 7- Incuber pendant 30+ou-2minutes.
- 8- Préparer 8 ml de solution de rinçage diluée pour chaque barquette (plus 2 ml supplémentaire), en diluant la RINS SOLN 5X au $1/5^{\circ}$ dans de l'eau distillée.
- 9- Préparer 2 ml de conjugué dilué pour chaque barquette (plus 2 ml supplémentaire), en diluant le CONJ 100X au $1/100^{\circ}$ dans du CONJ DIL; même dilution pour le SUBS BCIP/NBT 100X dans du SUBS BUF.
- 10- Garder le substrat dilué à l'abri de la lumière.
- 11- Remettre les différents réactifs à $+4^{\circ}\text{C}$, sauf le SUBS BUF.
- 12- Enlever le plateau du bain marie à la fin de l'incubation.

d- Réaction colorée :

- 1- Aspirer la solution de la barquette.
- 2- Ajouter 2 ml de solution de rinçage diluée dans chaque barquette et faire osciller le plateau 90 secondes à température ambiante.
- 3- Aspirer la solution.
- 4- Répéter les étapes 2 et 3.
- 5- Ajouter 2ml de conjugué dilué dans chaque barquette et placer le plateau sur agitateur oscillant réglé à 42 tr/mn, à température ambiante.
- 6- Incuber 30+ ou -2minutes.

- 7- A la fin de l'incubation, aspirer la solution dans chaque barquette.
- 8- Ajouter 2 ml de solution de rinçage diluée dans chaque barquette et faire osciller le plateau 90 secondes à température ambiante.
- 9- Aspirer la solution.
- 10- Répéter les étapes 8 et 9.
- 11- Ajouter 2ml de SUBS BUF dans chaque barquette et faire osciller le plateau 90 secondes à température ambiante.
- 12- Aspirer la solution dans chaque barquette.
- 13- Ajouter 2 ml de substrat dilué dans chaque barquette et placer le plateau sur l'agitateur à température ambiante.
- 14- Incuber pendant 30+ ou -2minutes.
- 15- Fin d'incubation, aspirer la solution.
- 16- Ajouter 2ml d'eau distillée dans chaque barquette.
- 17- Agiter pendant 3 à 4 minutes.
- 18- Aspirer l'eau.
- 19- Répéter les étapes 16 à 18.
- 20- A l'aide de pinces, enlever chaque bandelette des a barquette et la faire sécher entre 2 feuilles de papier absorbant.
- 21- Lire les résultats.
- 22- Conserver les bandelettes à l'abri de la lumière

❖ **Réactifs fournis dans le Kit:**

La trousse contient les réactifs et le matériel en quantité suffisante pour effectuer 40 tests, y compris les échantillons et les contrôles.

- Bandelettes : membranes de nitrocellulose recouvertes de sondes Oligo nucléotidiques spécifiques des différents génotypes du VHC.
- Conjugué concentré 100X (CONJ100X).
- Diluant du conjugué (CONJDIL).
- Solution de dénaturation (DENATSOLN).
- Solution d'hybridation et de lavage stringente (HYB_SWSOLN).
- Solution de rinçage concentrée (RINSESOLN5X).
- Tampon substrat (SUBSBUF).
- Substrat (SUBSBCIP_NBT100X).
- Plateaux Supportant chacun 8 barquettes qui servent à l'incubation des barquettes.
- Carte de lecture pour identifier les bandes positives sur une bandelette.
- Fiches de compte rendu des données.
- Tableau d'interprétation

Résumé :

L'infection par le virus d'hépatite C (VHC) est un problème majeur de santé publique, la transmission du VHC est essentiellement nosocomiale. Le VHC présente une grande variabilité génétique avec la distinction de génotypes (1à7) et de quasi-espèces, ce qui rend difficile la réalisation d'un vaccin .Pour typer le VHC il existe plusieurs méthodes à partir de l'ARN viral (génotypage), en fonction de ces génotypes on distinguera des bons et des mauvais répondeurs aux traitements qui ont subi une évolution rapide dans le temps pour aboutir à des molécules de dernières générations de plus en plus efficace, on utilise la technique d'hybridation inverse , D'après notre étude nous avons pu constater que le génotype 1(1b) le plus fréquent en Algérie est considéré comme mauvais répondeur aux traitement et prédominant dans notre échantillon.

Mots clés: Virus de l'hépatite C, variabilité génétique , génotypes ,génotypage

Summary :

Hepatitis C virus (HCV) infection poses a significant public health challenge, with transmission primarily occurring in healthcare settings. The virus exhibits extensive genetic diversity, classified into seven genotypes (1 to 7) and numerous quasi-species, complicating vaccine development. Several RNA-based methods are available for HCV genotyping, which help predict patient responses to treatment. Treatment options have evolved considerably, leading to increasingly effective therapies. Using reverse hybridization in our study, we found that genotype 1 (specifically 1b), the most prevalent in Algeria, is associated with poor treatment response and was predominant in our sample.

Key words : Hepatitis C virus, genetic variability, genotypes, genotyping

المخلص :

تعد عدوى فيروس التهاب الكبد الوبائي (HCV) مشكلة صحية عامة كبرى؛ يقدم فيروس التهاب الكبد الوبائي تبايناً وراثياً كبيراً مع التمييز بين الأنماط الجينية (من 1 إلى 7) وأشباه الأنواع، مما يجعل من الصعب إنتاج لقاح لفيروس التهاب الكبد الوبائي، هناك عدة طرق تعتمد على الحمض النووي الريبي الفيروسي (التميط الجيني)، اعتماداً على هذه الأنماط الجينية. التمييز بين المستجيبين الجيدين والسيئين للعلاجات التي شهدت تطوراً سريعاً مع مرور الوقت لتنتج جزيئات من أحدث الأجيال تكون أكثر فعالية، نستخدم تقنية التهجين العكسي بعد دراستنا تمكنا من ملاحظة أن النمط الجيني 1 (1ب) يعتبر الأكثر شيوعاً في الجزائر مستجيباً ضعيفاً للعلاج وهو السائد في عينتنا.

الكلمات المفتاحية: فيروس التهاب الكبد الوبائي ج ، التباين الوراثي، الأنماط الجينية، التميط الجيني.

