



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



## **PROJET DE FIN D'ETUDES**

**Licence en Sciences & Techniques :**  
**Sciences Biologiques appliquées et Santé**

# **Dépistage de l'hépatite C chez les donneurs de sang au CRTS de Fès**

**Présenté par :** ER-RAFIY MOHAMED

**Encadré par :**

Pr : SQALLI HAKIMA (Professeur à La FST de Fès)

Dr : SALHI SOUAD (CRTS Fès)

**Soutenu le :** 17-06-2015

Devant le jury composé de :

Pr : SQALLI HAKIMA

Pr : EL ABIDAKAOUAKIB

Dr : SALHI SOUAD

Année Universitaire : 2014-2015

## *Dédicaces*

*Je dédie ce mémoire de fin d'études  
à toute ma famille, à mes amies,  
et à toute personne qui a contribué  
à la réalisation de ce travail.*

# *Remerciement*

*Je tiens d'abord à présenter mes chaleureux remerciements à :*

*Madame SQALLI Hakima mon Professeur encadrante d'avoir bien accepté de diriger ce travail, pour tout son soutien, sa disponibilité et ses précieux conseils.*

*Dr BENYASRHI Abderrahim, Médecin Directeur du centre régional de transfusion sanguine de Fès, pour m'avoir permis de réaliser ce stage dans de bonnes conditions*

*Mademoiselle SALHI Souad, mon encadrante au sein du centre de transfusion sanguine, d'avoir accepté de m'accueillir au sein du Centre, pour sa générosité, sa disponibilité permanente.*

*Je tiens également à remercier Madame El ABIDA kaouakib d'avoir accepté de participer et juger ce projet de fin d'études.*

*A: Mr Abdalilah (Infirmier Chef), Mr Lachkar Hassan (responsable du Laboratoire de sérologie), Mr Benaissa (Responsable du Laboratoire de production)... et toute l'équipe du centre de transfusion.*

*Mes remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui auront contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire*

# ***SOMMAIRE***

	Page
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	1
<b>CHAPITRE 1 : GENERALITES</b>	2
<b>I- HEPATITE.....</b>	2
1-1- Définition.....	2
1-2- Hépatites virales.....	2
1-3- Symptômes.....	3
<b>II- HEPATITE VIRALE C.....</b>	3
2-1- Evolution.....	3
2-2- Statistiques et répartition géographiques.....	3
<b>III- VIRUS DE L'HEPATITE C (HCV).....</b>	4
3-1- Découverte.....	4
3-2- Structure.....	4
3-3- Réplication.....	5
3-4- Transmission.....	5
<b>IV- DIAGNOSTIC.....</b>	6
4-1- Diagnostic indirect.....	6
4-2- Diagnostic direct.....	6
<b>V- TRAITEMENT.....</b>	6
<b>CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES</b>	8
<b>I- TEST BIOLOGIQUE : DETECTION DES ANTICORPS ANTI-HCV.....</b>	8
1-1-Test ELISA.....	8
1-2-Principe de la réaction ELISA.....	8
<b>II- TECHNIQUE DE DEPISTAGE .....</b>	8
2-1- But de la technique.....	8
2-2- Principe de la technique :.....	8
2-3- Matériels utilisés.....	9

2-4- Préparation des réactifs.....	10
2-5- Mode opératoire.....	12
2-6- Calcul et interprétation des résultats.....	14
III- TRANSCRIPTION DES RESULTATS.....	14
<b>CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION</b>	15
I- RESULTATS DU TEST DE L'HEPATITE C.....	15
II- ETUDE STATISTIQUE.....	16
III- INTERPRETATION.....	18
<b>CONCLUSION GENERALE</b>	20
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	21

---

# *Liste des abréviations*

- Ac : Anticorps
- Ag : Antigène
- CRTS: Centre Régional de Transfusion Sanguine
- BS : Banques de Sang
- ELISA: Enzyme-LinkedImmunosorbentAssay
- HCV : Virus de l'hépatite C
- VHB : Virus de l'hépatite B
- SIDA : Syndrome d'Immuno-Déficienc e Acquis e
- TPHA : Treponema Pallidum HaemagglutinationAssay
- VIH : Virus de l'Immunodéficienc e Humaine
- RAI: recherche des anticorps irréguliers
- VS : valeur seuil
- DO : Densité optique
- IgG :immunoglobulines de type G
- PSL : Produits Sanguins Labiles
- PFC : Plasma Frais Congelé
- CPS : Concentré Plaquettaire Standard
- CGR : Culot Globulaire Rouge

# ORGANISATION DU CENTRE RÉGIONAL DE TRANSFUSION SANGUINE DE FÈS

## I- CENTRE REGIONAL DE TRANSFUSION SANGUINE (CRTS) DE FES

Le centre régional de transfusion sanguine de Fès fait partie du réseau National de Transfusion Sanguine composé de 16 CRTS, de 13 Banques de Sang (BS) et 24 Antennes de Transfusion, tous sous la dépendance du Centre National de Transfusion Sanguine (CNTS) placé sous la tutelle du Ministère de la santé.

Le centre de transfusion doit comporter :

- Salle d'accueil ;
- Salle de prélèvement ;
- Bureau de médecin ;
- Cafeteria et salle de repos pour les donateurs ;
- Laboratoire d'immuno-hématologie donneur (IHD) ;
- Laboratoire de sérologie ;
- Laboratoire de production ;
- Laboratoire d'immuno hémato receveur et distribution de PSL.

## II-ACTIVITES DU CRTS

Le centre de transfusion assure plusieurs tâches :

- Promouvoir le don du sang et organiser des collectes pour assurer l'autosuffisance en PSL de toute la région Fès-Boulemane ;
- Préparer et fournir les (PSL) nécessaires aux malades et aux banques de sang ;
- Garantir la qualité et la sécurité des produits ;
- Faire les tests immuno-hématologiques permettant d'éviter une incompatibilité donneur-receveur ;
- Assurer le contrôle médical des donateurs via l'examen biologique et chimique.

## III-ORGANISATION DU DON

### 3-1- Parcours du don

Le don de sang s'effectue au sein de centre de transfusion sanguine Fès, du lundi au vendredi. 80% des donateurs sont volontaire et 20% des donateurs de compensation (donneur de famille). Le don se déroule selon les étapes suivantes (Figure a) :

- Accueil :** Cette étape permet de recueillir les renseignements nécessaires pour constituer le dossier administratif du donneur (son nom, prénom, CIN, numéro de téléphone...).
- Consultation pré-don :** À l'occasion de chaque don, le donneur fait l'objet d'un contrôle clinique via un entretien médical et un examen général en vue d'éliminer certaines contre-indications.
- Prélèvement :** Toute personne en bonne santé, âgée de 18 à 60 ans, peut donner son sang. Le prélèvement consiste à prélever 450 ml à 500 ml de sang directement de la veine du donneur jusqu'à une poche de recueil qui contient un anticoagulant. Le nombre total de don par année ne doit pas dépasser 5 pour les hommes et 3 pour les femmes et l'intervalle doit être au moins égal à 8 semaines.
- Temps de repos:** Après le don du sang, le donneur reste sous la surveillance de l'infirmier préleveur pendant 10 min.

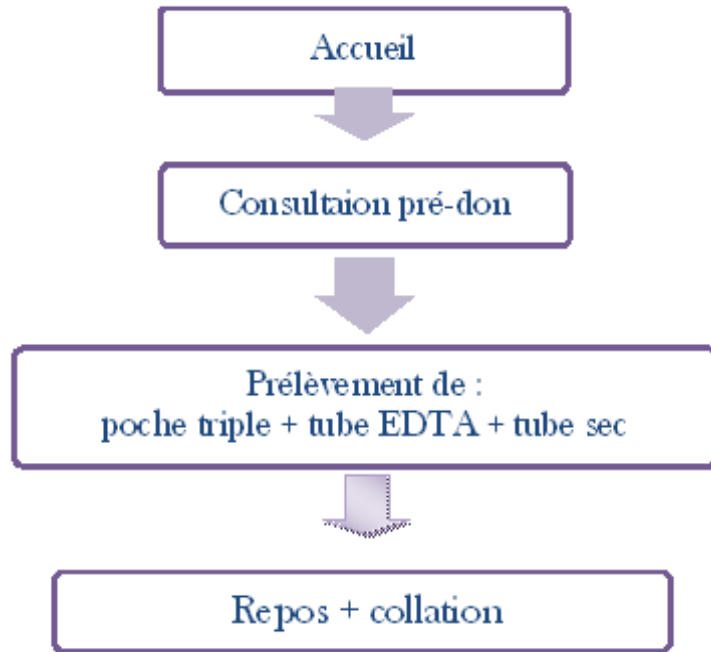


Figure a: Parcours du don.

### 3-2-Qualification biologique du sang et préparation des produits sanguins labiles (PSL)

Lorsque le sang est prélevé, il subit une préparation en produit sanguin labile (PSL), et les tubes échantillons prélevés sont soumis à des examens au sein des laboratoires de sérologie et hémato-immunologie (Figure b). Cette étape étant la plus importante dans la sécurisation du produit, elle est appelée: Qualification Biologique du Don.

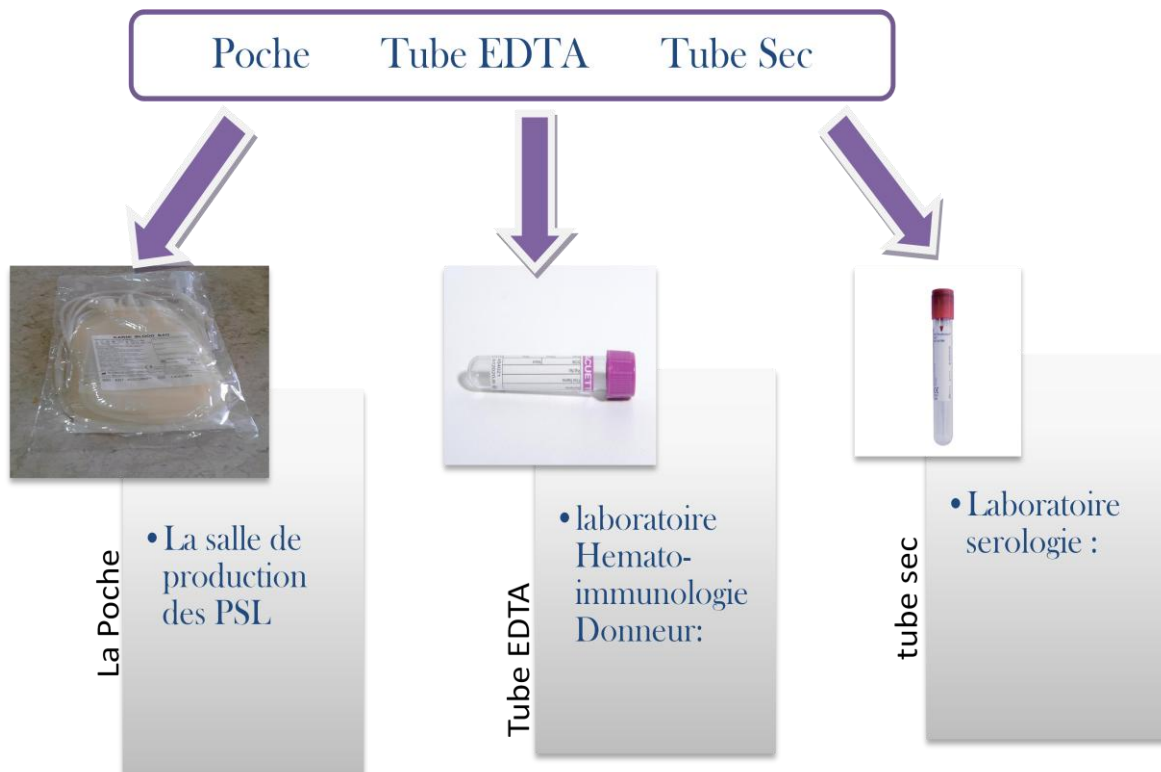


Figure b : Circuit de don.



### a. Laboratoire de production des PSL

Le sang total est séparé en trois produits : CGR, PFC et CPS. Le principe étant la centrifugation différentielle :

La Poche triple subit une double centrifugation

- 1<sup>re</sup> centrifugation (3600rpm/4min) du sang total : on obtient un surnageant (plasma riche en plaquettes) + un culot globulaire.
- 2<sup>me</sup> centrifugation du plasma (3600rpm/10min) : permet de séparer les plaquettes du plasma

#### Conservation des PSL

Produit	Durée	température
Culot globulaire	42 jours	-26° C
Plasma	1 année	-25° C
plaquettes	5 jours (sous agitation)	22° C

### b. Laboratoire d'Hémo-immunologie

Réalisation des tests immuno-hématologiques :

- Groupage sanguin : Chez les êtres humains, le groupe sanguin est déterminé en fonction des substances présentes à la surface des globules rouges, appelées «antigènes» Ag. Les groupes sanguins sont regroupés en «systèmes», dans le système ABO, il existe quatre groupes sanguins possibles : A, B, O et AB.
- Dépistage des hémolysines : On appelle hémolysine, une substance susceptible de causer une hémolyse, c'est-à-dire une destruction des globules rouges.
- -Recherche des anticorps irréguliers : La RIA consiste à mettre en évidence et à identifier la présence d'anticorps dirigés contre des antigènes présents sur les globules rouges du patient

### c. Laboratoire de sérologie

Dépistage sérologique des maladies transmissibles par le sang chez les donneurs de sang pour assurer la sécurité transfusionnelle chez le receveur :

- Dépistage de la syphilis par le TPHA (*Treponema Pallidum* hemagglutination)
- Détection des antigènes HBs.
- Dépistage des antigènes et des anticorps anti VIH
- Dépistage des antigènes et anticorps anti-VHC

### 3-3- La délivrance de produits sanguins labiles

C'est la mise à disposition des produits sanguins labiles pour les receveurs sur prescription médicale qui sont :

- Accidentés de route ;
- Les grands brûlés ;
- Divers malades: anémie, infections graves, leucémie ;
- Greffes d'organes ;
- Opérations chirurgicales ;
- Fabrication des médicaments.

# INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'hépatite est une inflammation du foie, le plus souvent causée par une infection virale, mais parfois par l'alcoolisme, ou par une intoxication par un médicament ou par un produit chimique. Elle évolue sous une forme aiguë et /ou chronique et présente des manifestations cliniques variables depuis la forme asymptomatique jusqu'à la forme grave et mortelle.

L'hépatite C (HCV) est une maladie causée par un virus qui s'attaque aux cellules du foie et entraîne son inflammation ; il s'agit donc d'une hépatite virale. Ce virus est présent dans le sang d'une personne infectée et fait partie des maladies à déclaration obligatoire.

Le centre régional de transfusion sanguine de Fès fait partie du réseau National de Transfusion Sanguine qui a pour rôle :

- Sensibilisation sur l'importance de la régularité des dons du sang ;
- Préparer et fournir les produits sanguins labiles (PSL) ;
- Faire des tests immuno-hématologiques permettant d'éviter une incompatibilité donneur-receveur ;
- Assurer la qualification sérologique des dons sanguins et le dépistage des virus dits «majeurs».

La qualification sérologique des dons se base sur la mise en évidence des virus dans le sang du donneur (recherche de marqueurs du SIDA (Ag-Ac HIV), de l'hépatite B (Ag HBs) et de l'hépatite C (Ag-Ac HCV) ainsi que la recherche de l'agent causal de la syphilis) afin d'éviter tout type de contamination lors de la transfusion sanguine. Cette transfusion a un rôle primordial et présente un geste noble et un acte de solidarité des sujets sains et bénévoles "donneurs" vers des sujets malades "receveurs" souffrant d'un déficit en un des composants sanguins, une anémie périphérique ou centrale, ou dans le cas d'un accident...,etc.

Durant la période du stage au sein du centre régional de transfusion sanguine de Fès, le diagnostic sérologique de l'hépatite C était le principal objectif, ainsi que la maîtrise des techniques de dépistage qui reposent sur la recherche des anticorps anti-HCV et la détection de l'antigène de capsid du HCV, par un test ELISA, chez les donneurs de sang.

# CHAPITRE 1

## GENERALITES

### I- HEPATITE

#### 1-1- Définition

L'hépatite désigne toute inflammation aiguë ou chronique du foie (OMS, 2014). Cette maladie peut évoluer spontanément vers la guérison ou progresser vers la fibrose (cicatrisation), la cirrhose ou le cancer du foie. L'hépatite peut être :

- Virale : causé par les virus. C'est l'hépatite la plus courante dans le monde ;
- Non virale : causé par des substances toxiques comme l'alcool ou certaines drogues).
- Des maladies auto-immunes peuvent aussi être à l'origine de cas d'hépatite.

#### 1-2- Hépatites virales

Il existe cinq types de virus de l'hépatite (désignés par les lettres A, B, C, D et E). Les virus des types B et C, en particulier, entraînent une hépatite chronique chez des centaines de millions de personnes et sont la cause la plus courante de cirrhose et de cancer du foie.

- **Virus de l'hépatite A (VHA)** : est présent dans les selles des sujets infectés et se transmet le plus souvent lors de la consommation d'eau ou d'aliments contaminés, mais aussi dans le cadre de certaines pratiques sexuelles. Dans bien des cas, les manifestations de l'infection sont bénignes et le sujet guérit et acquiert une immunité. Mais l'infection peut aussi être grave. Il existe des vaccins sûrs et efficaces contre le VHA.
- **Virus de l'hépatite B (VHB)** : se transmet lors de l'exposition à du sang, du sperme et d'autres liquides biologiques. Il peut se transmettre de la mère à l'enfant au moment de l'accouchement. Le virus peut aussi se transmettre à l'occasion d'une transfusion de sang ou de produits sanguins contaminés, d'injections pratiquées avec du matériel contaminé dans le cadre d'un acte médical ou de la consommation de drogues injectables. Il existe un vaccin sûr et efficace contre le VHB.
- **Virus de l'hépatite C (VHC)** : se transmet principalement lors de l'exposition à du sang infecté (transfusion de sang ou de produits sanguins contaminés, injections pratiquées avec du matériel contaminé dans le cadre d'un acte médical et consommation de drogues injectables). La transmission sexuelle est également possible mais beaucoup plus rare. Il n'existe pas de vaccin contre le VHC.

- **Virus de l'hépatite D (VHD)** : L'infection ne se produit que chez les sujets infectés par le VHB. La co-infection par le VHD et le VHB peut aggraver la maladie et assombrir le pronostic. Les vaccins sûrs et efficaces contre l'hépatite B protègent de l'infection à VHD.
- **Virus de l'hépatite E (VHE)** : comme le VHA, ce virus se transmet en général lors de la consommation d'eau ou d'aliments contaminés. Des vaccins sûrs et efficaces contre l'infection par le VHE ont été mis au point mais ils ne sont pas couramment disponibles.

### 1-3- Symptômes

Les symptômes de l'hépatite sont les suivants ;

- Ictère (jaunissement de la peau et des yeux) ;
- Urines foncées ;
- Grande fatigue, des douleurs musculaires ;
- Nausées ;
- Pertes d'appétit ;
- Vomissements et douleurs abdominales.

## II- HEPATITE VIRALE C

C'est une maladie infectieuse transmissible par lesanget due à un virus (VHC) qui s'attaque aux cellules du foie. L'infection se caractérise par une inflammation du foie (l'hépatite) qui est souvent asymptomatique.

### 2-1- Evolution

L'évolution du virus est classée en deux phases :

- les six premiers mois suivants la contamination par le VHC compose la phase aigüe. Durant cette période, les trois quarts des individus infectés ne ressentiront aucun symptôme
- Après 6 mois d'infection, le terme phase aigüe est remplacé par phase chronique.

### 2-2- Statistiques et répartition géographiques

En 1999, l'OMS estimait qu'environ 3% de population mondiale était infectée par le virus de l'hépatite C et qu'au moins 170 millions de porteurs chroniques du virus étaient ainsi exposés aux risques de complications qu'il s'agisse du développement d'une cirrhose ou de l'apparition du cancer du foie.

Des données plus récentes rapportent une prévalence légèrement inférieure et voisine de 2.2% (Trépo et al. 2006).

La distribution géographique est variable : avec des zones à prévalence très élevée comme l'Afrique ou l'Asie où la prévalence peut dépasser 10 %, et des régions de basse endémie telles que l'Amérique du Nord ou l'Europe occidentale avec une prévalence voisine de 1%. Ainsi, l'Europe et l'Amérique du Nord compteraient environ 22 millions de sujets séropositifs pour le VHC contre 147 millions pour le reste du monde, dont 32 millions en Afrique.

Au Maroc, la prévalence exacte de l'infection par le VHC n'est pas bien connue. Les pays du pourtour méditerranéen et d'après l'OMS, auraient une prévalence moyenne qui varie de 1 à 2.49 % (Figure 1).

Ce classement est basé sur les résultats d'une étude préliminaire publiée en 1996 et estimant à 1.1 % la prévalence des anti-VHC chez les donneurs de sang marocains. (Benjelloun et al, 1996).

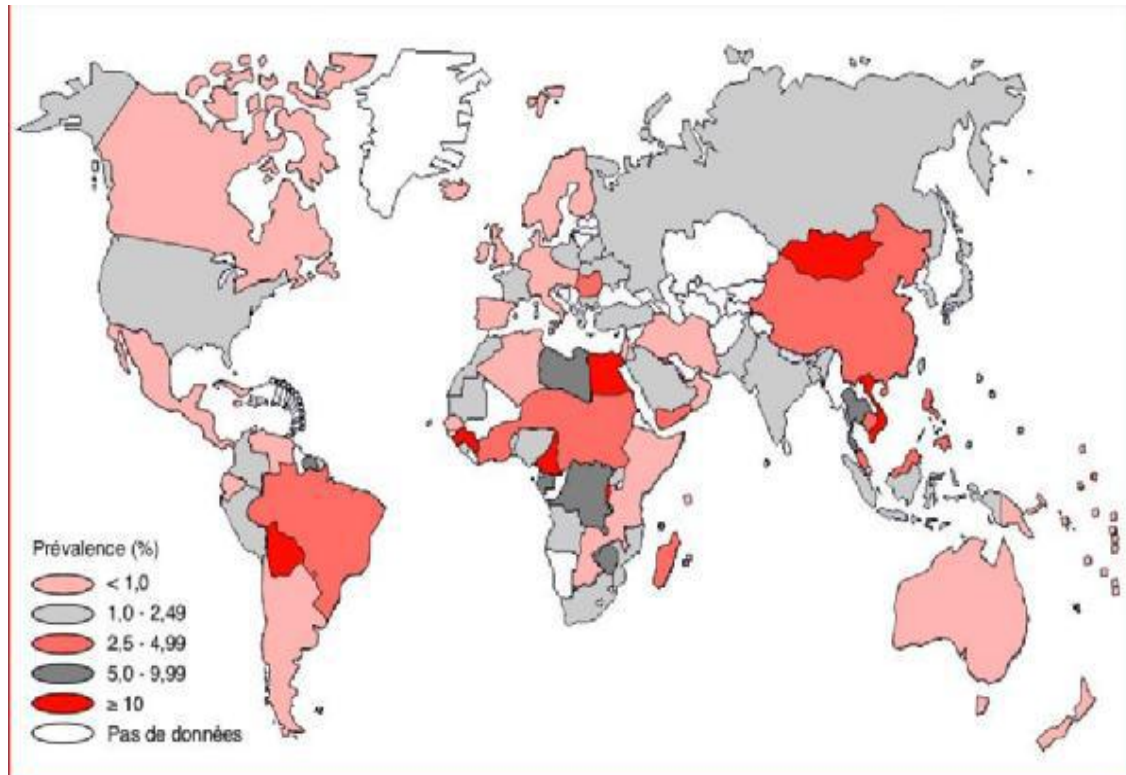


Figure 1 : Distribution de la séroprévalence anti-VHC selon les pays (OMS)

### III- VIRUS DE L'HEPATITE C (HCV)

#### 3-1- Découverte

La découverte successive du virus de l'hépatite B puis du virus de l'hépatite A, au cours des années 1960-70, a permis d'identifier un groupe d'hépatite transmissibles à l'homme et au chimpanzé dont les caractéristiques cliniques et épidémiologiques pouvaient les rapprocher des hépatites A et B. Le terme provisoire d'hépatites «nonA-nonB» avait été proposé et la recherche de l'agent causal faisait l'objet de nombreux travaux. Ce n'est qu'en 1989 que l'utilisation des techniques modernes de biologie moléculaire a permis l'identification des virus responsable de la majorité des hépatites nonA-nonB à transmission parentérale "virus de l'hépatite C". (F lunel-fabiani, 2002)

#### 3-2- Structure

La structure du HCV sa physiologie sont de mieux en mieux connues et les outils de diagnostic sont de plus en plus performants.

Le virus HCV a été découvert en 1989 grâce à une collaboration entre les équipes de Houghton et Bradley. C'est un petit virus enveloppé, de 55 à 65 nm de diamètre (Figure 2) qui a aujourd'hui, été visualisé en microscopie électronique.

Son génome est un ARN monocaténaire de polarité positive d'environ 10000 nucléotides. Il est contenu dans une capsidie protéique icosaédrique, elle-même située à l'intérieur d'une enveloppe lipidique dans laquelle sont insérées deux protéines E1 et E2. Son poids moléculaire serait voisin de  $4.10^6$  Daltons.

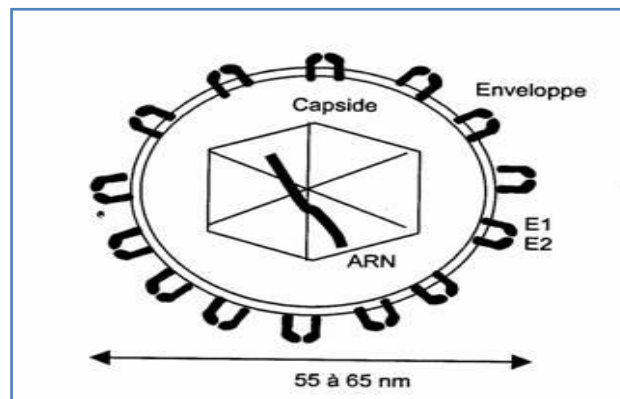


Figure 2 : Structure du VHC.

Tableau 1 : Caractéristiques de HCV.

Famille	Flavivirus
Genre	Hepacivirus
Acide nucléique	ARN
Capsidie	icosaédrique
Enveloppe	Présente
Diamètre	55 à 65 nm

### 3-3- Réplication

Après la pénétration du virus dans la cellule cible et sa décapsidation, le précurseur polyprotéique serait synthétisé par les ribosomes cellulaires directement à partir de l'ARN de HCV, puis il serait clivé en différentes protéines. Comme pour les flavivirus, la réplication de l'ARN génomique se fait grâce à la synthèse de brins à polarité négative nommés (brins négatifs) complémentaires de l'ARN viral, par l'ARN-polymerase-ARN dépendante. De tels brins négatifs ont pu être mis en évidence dans le foie et les leucocytes circulants (lymphocytes B) chez des sujets infectés par le HCV. (Deni, 1999).

### 3-4- Transmission

- **Parentérale** : Dans 60 à 70 % des cas, une transmission parentérale du HCV, résultant d'un contact direct avec du sang contenant le virus, peut être identifiée. Dans ce cadre, les deux principaux modes de transmission sont : la transfusion sanguine (produits sanguins et dérivés) et la toxicomanie intraveineuse.
- **Sexuelle** : Des modes de transmission mineurs ont été identifiés. La transmission sexuelle du HCV est possible, mais son incidence serait très faible.
- **Intra-familiale** : ce type de transmission reste la transmission par le sang, résultant de l'utilisation commune aux membres d'une même famille d'objets personnels tels que ciseaux, peignes, rasoirs, brosses à dents.
- **mère-enfant** : Le risque de transmission mère-enfant du HCV apparaît faible, de

l'ordre 3%. Le risque de transmission est d'autant plus élevée que la charge virale, c'est à dire la concentration de particules virales circulantes, est élevée chez la mère. Seules les femmes ayant les plus fortes charges virales transmettent le virus à leur enfant.

- **Infection (sporadique)** : Finalement, chez 30 à 40% des malades ayant une infection par le HCV, aucun facteur de risque d'infection n'est trouvé. la possibilité d'une transmission par les soins dentaires, le rasage, les tatouages, le percement d'oreilles ou divers manœuvres instrumentales souvent d'origine nosocomiale (cathétérismes, endoscopie, biopsies per-endoscopiques, chirurgie...etc) a été évoquée.

## IV- DIAGNOSTIC

### 4-1- Diagnostic indirect

Face à une suspicion d'hépatite à VHC, on doit suivre les étapes suivantes :

1. **Dépistage** du VHC par sérologie. Si le résultat de la sérologie est positif ou douteux ;
2. **Confirmation** sérologique sur un nouvel échantillon avec une technique ELISA différente.

Donc un dépistage des Ac spécifiques dans le sérum (IgG + IgM) puis une confirmation avec un test différent sur un second échantillon. Les dépistages deviennent positifs environ 2 à 3 mois après le comptage et deux échantillons sont nécessaires pour affirmer la présence d'Ac anti-HCV.(Pasquier et al., 2005)

### 4-2-Diagnostic direct

- **Détection du génome HCV** dans le sérum par RT-PCR (seuil 10 µl/ml) ou par d'autres tests de biologie moléculaire (TMA). Elle permet un diagnostic précoce en cas de suspicion d'hépatite C aigue, confirme le diagnostic d'infection chronique (positif plus de 6 mois), permet le suivi thérapeutique et d'objectiver une éventuelle guérison.
- **La quantification du génome HCV** permet de mesurer l'effet antiviral au cours des trois premiers mois de traitement.
- **La détermination du génotype viral** (1 à 6) par biologie moléculaire (hybridation ou séquençage) ou par sérologie permet de définir la durée optimale du traitement antiviral. les recommandations actuelles sont 6 mois pour les génotypes 2 et 3 présentant une bonne sensibilité intrinsèque et de 12 mois pour les autres génotypes.

## V- TRAITEMENT

L'hépatite C ne nécessite pas toujours un traitement puisque chez certaines personnes, la réponse immunitaire éliminera l'infection. Lorsque le traitement est nécessaire, l'objectif est la guérison. Le taux de guérison dépend de plusieurs facteurs, y compris de la souche du virus et du type de traitement donné. Un dépistage approfondi est nécessaire avant de commencer le traitement afin de déterminer quelle est l'approche la mieux adaptée pour le patient(OMS, 2014).

Le traitement standard actuel est le traitement combiné par l'interféron et la ribavirine, qui est efficace contre tous les génotypes du virus de l'hépatite C.

- L'interféron :est une molécule naturellement présente dans l'organisme qui a pour rôle d'augmenter les réponses du système immunitaire lors d'une agression comme c'est le cas dans l'hépatite C.

Deux types d'interféron sont disponibles :

- l'interféron standard, qui doit être administré par injection sous-cutanée trois fois par semaine, et
  - l'interféron pégylé qui ne nécessite qu'une seule injection par semaine ;
- La ribavirine : molécule qui permet de potentialiser, c'est-à-dire d'augmenter, l'effet de l'interféron. Elle se présente sous forme de gélules que l'on prend par voie orale.



# CHAPITRE 2

## MATERIELS ET METHODES

### I- TEST BIOLOGIQUE: DETECTION DES ANTICORPS ANTI-HCV

Il existe de nombreuses techniques de dépistage sérologique dont le but principal est de rechercher dans les échantillons de sérum la présence d'anticorps contre ce virus, dans ce cas la recherche est basée sur le test sérologique ELISA.

#### 1-1- Test ELISA

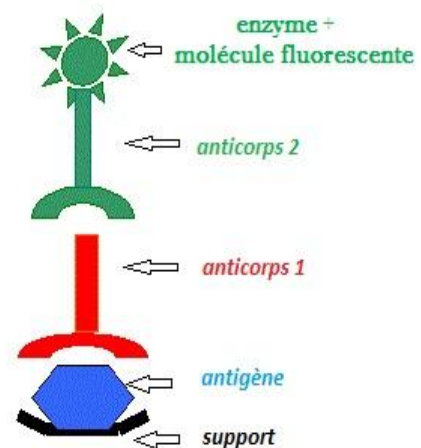
C'est un test immunologique destiné à détecter et /ou doser une protéine dans un liquide biologique.

Permet de visualiser une réaction Antigène-anticorps (Ag-Ac) grâce à une réaction colorée produite par l'action d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps sur un substrat chromogène.

#### 1-2- Principe de la réaction ELISA

- L'**Antigène** (réactif commercial) est d'abord fixé sur un support solide (plaque 96 puits sensibilisés).
- **anticorps 1** (Sérum supposé contenir les **anticorps** humain recherchés) ;
- Détection du complexe antigène-anticorps par fixation d'un 2eme anticorps = **anticorps 2** (réactif commercial) qui est un Ac anti-immunoglobuline humaine.
- marqué par une **enzyme** et un substrat d'enzyme (**molécule fluorescente**)

La réaction catalysée par l'enzyme libère un composant coloré mesurable par spectroscopie



### II- TECHNIQUE DE DEPISTAGE

#### 2-1- But de la technique

Monolisa™ HCV Ag-Ac est un test immuno-enzymatique qualitatif pour la mise en évidence de l'infection à VHC, basé sur la détection des anticorps et de l'antigène de capsid associés à une infection par le virus de l'hépatite C dans le sérum ou le plasma humain.

#### 2-2- Principe de la technique

- La microplaque est sensibilisée avec :
  - Un anticorps monoclonal dirigé contre la capsid de l'hépatite C ;
  - 2 protéines recombinantes correspondant à la région NS3 ;

- Une protéine recombinante correspondant à la région NS4 ;
  - Un peptide muté correspondant à la région capsidique de l'hépatite C.
- Les conjugués (Tableau 1) utilisés sont :
    - Conjugué 1 : Un anticorps monoclonal murin biotinylé dirigé contre la capsidique de l'hépatite C, (Cet anticorps monoclonal ne réagit pas contre le peptide muté capsidique utilisé sur la phase solide).
    - Conjugué 2 : Le conjugué 2 est un mélange d'anticorps murins anti IgG humaine marqué à la peroxydase et de streptavidine marquée à la peroxydase.

La mise en œuvre du test comprend les étapes réactionnelles suivantes :

- 1) Le conjugué 1 puis Les échantillons à étudier et les sérums de contrôle sont distribués dans les puits de la microplaque. Si des anticorps anti-HCV sont présents, ils se lient aux antigènes fixés sur la phase solide. Si des antigènes de capsidique de l'hépatite C sont présents, ces antigènes sont liés par les anticorps monoclonaux de la phase solide et les anticorps monoclonaux biotinylés du conjugué 1.
- 2) Après une incubation de 90 minutes à 37°C et une étape de lavage, le conjugué 2 contenant des anticorps anti IgG humaines marqués à la peroxydase et de la streptavidine marquée à la peroxydase sont ajoutés à chaque puits de la microplaque. Dans le cas de présence d'IgG humaines ayant réagi avec la phase solide, le conjugué anti IgG humain se lie aux anticorps humains. Le conjugué peroxydase/streptavidine se fixe sur la biotine du conjugué 1 dans le cas d'une présence de l'antigène de capsidique du virus de l'hépatite C dans l'échantillon.
- 3) Après 30 minutes d'incubation à 37°C et élimination des conjugués enzymatiques non liés par lavage, la présence des complexes antigène-anticorps-peroxydase sont révélés par addition du substrat.
- 4) Après 30 minutes d'incubation à température du laboratoire et arrêt de la réaction, la lecture s'effectue au spectrophotomètre à 450/620 nm. L'absorbance mesurée pour un échantillon permet de conclure quant à la présence ou l'absence d'anticorps anti-VHC et/ou d'antigène de capsidique de l'hépatite C dans l'échantillon testé. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-HCV et/ou d'antigène capsidique de l'hépatite C liés sur la phase solide.

### 2-3- Matériels utilisés

- **Automate BEP 2000** : Dans le cas de la technique d'ELISA, on travaille automatiquement en utilisant l'automate (Figure 3) qui est un appareil d'analyse sérologique avec :
  - Ordinateur intégré & Système de lavage automatique
  - incubateur sec, pouvant être thermostaté à 37°C
  - Conteneur de déchets contaminés.
  - Appareil de lecture pour microplaques (spectrophotomètre).

Ce système est parfaitement adapté aux besoins du test réalisant la distribution des volumes d'échantillons et des réactifs.

- **Centrifugeuse (ROTOFIX 32)** : Pour la centrifugation (Figure 4) des échantillons (avec une capacité de 68 tubes).
- **Tube à échantillon** : Pour chaque sujet concerné, un prélèvement du sang a été effectué dans un flacon sec et stérilisé (Figure 5).
- **Microplaque** : C'est une plaque de plastique (Figure 6) contenant des puits (alignés en 8 rangées x 12 colonnes), sensibilisées avec un anticorps monoclonal anti-capside du HCV et des antigènes recombinants purifiés (NS3, NS4).  
Ces plaques doivent être transparentes pour permettre à la lumière d'émission de la fluorescence d'être détectée.
- **Réactifs et leurs compositions** : La trousse des réactifs (Figure 7) comporte une Solution d'arrêt, Substrat, Solution de lavage (concentrée), des témoins et 2 Conjugués, dont la composition est donnée dans le tableau 1.
- **Autres Matériels**:
  - Eprouvettes graduées de 1000 ml.
  - Eau distillée ou complètement déminéralisée.
  - Eau de javel et bicarbonate de soude.
  - Gants à usage unique.
  - Embouts jetables (pour éviter les contaminations) : deux tailles d'embouts (300 µl et 1100 µl) pour des distributions uniques et multiples.

#### 2-4- Préparation des réactifs

- **Réactifs prêts à l'emploi**
  - Conjugué 1 : prêt à l'emploi. (Homogénéiser par retournement avant utilisation).
  - Conjugué 2 : prêt à l'emploi. (Homogénéiser par retournement avant utilisation).
  - Contrôle positif Ac : prêt à l'emploi
  - Contrôle négatif : prêt à l'emploi
  - Solution d'arrêt: prêt à l'emploi
- **Réactifs à reconstituer**
  - Solution de lavage : Pour préparer ce liquide, il faut diluer la solution de lavage au 1/20<sup>ème</sup> avec de l'eau distillée (800 ml pour une plaque de 96 puits)
  - contrôle positif Ag : On remplit le flacon du contrôle positif Ag avec la totalité de diluant et on le laisse 10 minutes à température du laboratoire en agitant de temps en temps le flacon par inversion du flacon.



Figure 3 : Automate.



Figure 4 : Centrifugeuse.



Figure 5 : Flacon sec.



Figure 6 : Microplaque.



Figure 7 : Ensemble des réactifs.

**Tableau 1 : Composition des réactifs**

Nom	Nature du réactif
<b>Solution de lavage (R2)</b>	- Tampon Tris NaCl - Conservateur
<b>Conjugué 1 (R6)</b>	- Anticorps monoclonal dirigé contre la capsid e du HCV marqué. - Conservateur : Azide de sodium
<b>Conjugué 2 (R7)</b>	- Anticorps murins anti-IgG humaines marqués - Conservateur
<b>Témoins</b>	<u>Contrôle négatif (R3) :</u> - Tampon Tris HCl, contenant de la SAB - Conservateur
	<u>Contrôle positif AC (R4):</u> - Sérum humain contenant des anticorps anti-HCV - Conservateur
	<u>Contrôle positif Ag (R5a) + le diluant (R5b) :</u> - Antigène positif synthétique de contrôle contenant un peptide de capsid e lyophilisé
<b>Tampon substrat de la peroxydase (R8)</b>	- Solution d'acide citrique et d'acétate de sodium pH 4,0 contenant 0,015% d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> et 4% de diméthylsulfoxyde
<b>Chromogène (R9)</b>	- Solution contenant du tétraméthyl benzidine (TMB)
<b>Solution d'arrêt (R10)</b>	- Solution d'acide sulfurique 1 N

## 2-5- Mode opératoire

Le test commence après avoir :

- Démarrer le système ;
- Contrôler toutes les fonctions de l'appareil « BEP2000 » ;
- Préparer les réactifs ;
- Charger les réactifs nécessaires et les échantillons.

Le mode opératoire est complètement automatisé grâce au système BEP 2000 qui réalise toutes les étapes de tests : du pipetage des réactifs, à l'incubation, au lavage, à la lecture photométrique et à l'interprétation des résultats (Figure 8). Les étapes du mode opératoire sont données par le (tableau 2).

La lecture s'effectue au spectrophotomètre (intégré) à 450/620 nm. L'absorbance mesurée pour un échantillon permet de conclure la présence ou l'absence d'anticorps anti-HCV et/ou d'antigène capsid e de l'hépatite C dans l'échantillon testé.

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-HCV et/ou d'antigène capsid e de l'hépatite C liés sur la phase solide.

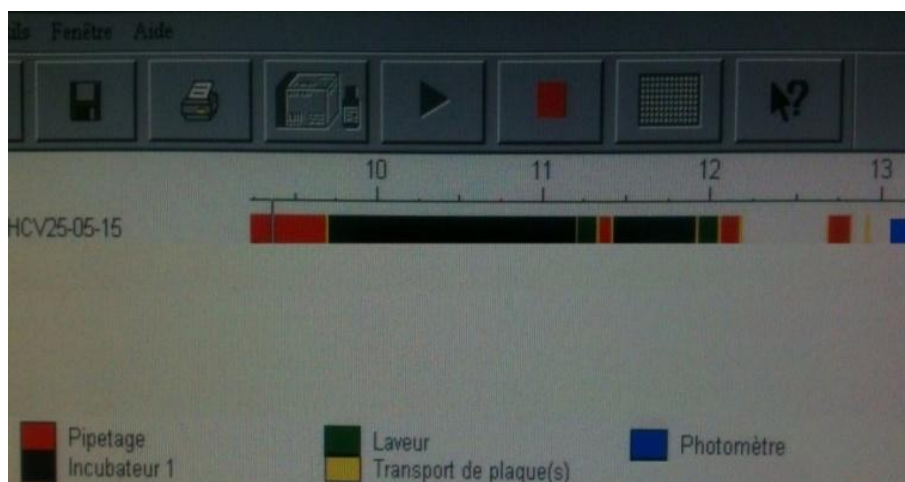


Figure 8 : Schéma du travail affiché par l'automate.

Tableau 2 : Mode opératoire.

- **1<sup>ère</sup> Etape : distribution du conjugué 1**  
100 µl du conjugué est distribuer dans les puits de la microplaque
- **2<sup>ème</sup> Etape : distribution des temois**  
50 µl du contrôle négatis dans le 1<sup>er</sup> puit ( A1 )  
50 µl du contrôle positif Ac puit 2,3 et 4 ( B1,C1, D1)  
50 µl du contrôle positif Ag dans le 5eme puit ( E1 )
- **3<sup>ème</sup> Etape : distribution des échantillons (serum)**  
50 µl de sérum (à partir du 6<sup>ème</sup> puit jusqu'au dernier)  
(incubation 90min à 37° c)  
Puis Lavage (5 cycles)
- **4<sup>ème</sup> Etape : distribution du conjugué 2**  
100 µl de conjugué 2 (dans les 96 puits de la microplaque)  
(incubation 30 min à 37°c )  
Puis Lavage (5 cycles)
- **5<sup>ème</sup> Etape : distribution du substrat**  
80 µl du substrat (dans les 96 puits de la microplaque)  
(incubation 30min à T° ambiante)
- **6<sup>ème</sup> Etape : distribution de la solution d'arrêt**  
100 µl solution d'arrêt

## 2-6- Calcul et interprétation des résultats

La présence ou l'absence des anticorps anti-HCV et/ou de l'antigène capsidique du HCV est déterminée en comparant pour chaque échantillon l'absorbance enregistrée à celle de la valeur seuil calculée.

- **Calcul de la moyenne des absorbances mesurées pour le contrôle positif**

Exemple : Densité optique des 3 contrôles positifs (B1, C1, D1) :

puit	D.O.
B1	1,636
C1	1,704
D1	1,650
Total	4,990

$$\text{Moyenne DO} = \frac{\text{D.O. Totale}}{3} = \frac{4,990}{3} = 1,663$$

- **Calcul de la valeur seuil (Vs) :**

$$V_s = \frac{\text{Moyenne DO}}{5}$$

$$\text{Si Moyenne DO} = 1,663 \text{ --- } > V_s = \frac{1,663}{5} = 0,332$$

- **Interprétation des résultats :**

Les échantillons dont la densité optique est inférieure à la valeur seuil sont considérés négatifs d'après le test Monalisa™ HCV Ag-Ac

Les échantillons dont la densité optique est supérieure ou égale au seuil sont considérés comme initialement positifs et doivent être retestés en double avant l'interprétation finale. Après répétition de l'essai, l'échantillon est considéré positif

Dans ce cas, le patient est invité pour réaliser un deuxième prélèvement pour vérifier s'il est vraiment un cas positif.

## III- TRANSCRIPTION DES RESULTATS

Finalement chaque résultat doit être enregistré sur un registre. Ce registre de transcription, présent dans le laboratoire comporte toutes les données nécessaires pour chaque échantillon :

- Le numéro de don.
- Le type d'analyse.
- La date d'analyse.
- Les noms et les numéros de lots des réactifs.
- L'identification des témoins utilisés.
- la valeur seuil, le résultat brut et le résultat net.

# CHAPITRE III

## RESULTATS ET DISCUSSION

### I- RESULTATS DU TEST DE L'HEPATITE C

Le dépistage de l'hépatite C (HCV) chez les donneurs de sang est un test obligatoire pour assurer la sécurité transfusionnel du receveur.

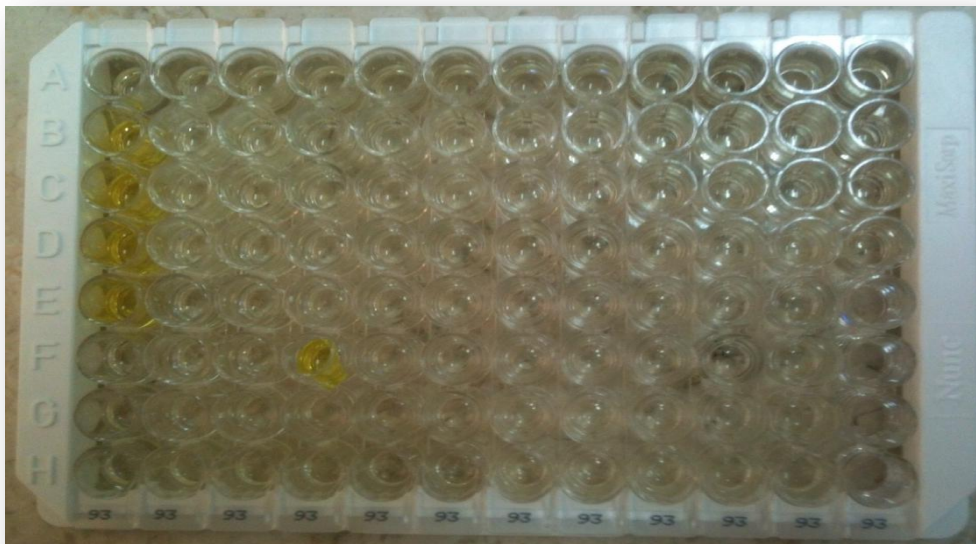
Le diagnostic sérologique repose sur le test ELISA, à l'aide de l'automate BEP 2000, permettant la détection d'anticorps spécifiques de l'agent infectieux.

A la suite de la corrélation des D.O des échantillons avec la lecture macroscopique et de la détermination de la valeur seuil, les échantillons sont classés en:

- Les échantillons qui ont une D.O  $\geq$  la valeur seuil sont dits **positifs**.  
Un résultat positif est le reflet d'un contact avec le virus VHC.
- Les échantillons qui ont une D.O  $\leq$  la valeur seuil sont dits **négatifs**.  
Un résultat négatif indique l'absence de contact antérieur avec le virus.

**Remarque:** La lecture visuelle est nécessaire pour détecter une éventuelle erreur du lecteur

✓ *Lecture de résultat :*



La figure 9 : Plaque représentant les résultats du test

La distribution des témoins négatif et positif (Ag et Ac) s'effectue dans les puits A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> et E<sub>1</sub>. alors que les autres puits correspondent aux échantillons testés.



Tout puits incolore validé par les critères de validations et la DO inférieur à la valeur seuil est considéré négatif.

Les tests positifs représentés par une coloration jaunâtre (puits F4 dans la figure 9) et une DO supérieur à la valeur seuil.

**Exemple d'un test positif :**

Critère de validation :

Témoin négatif =  $0,034 < 0,23$

$0,8 < \text{moyen de témoin positif } Ac = 1,15 < 2,4$

Témoin positif  $Ag = 0,75 > 0,5$

Valeur seuil =  $0,287$ .

Le puits F4 (Figure9)correspond à une D.O supérieur à la valeur seuil :  $DO = 0,79$

Il s'agit donc d'un échantillon positif.

## II- ETUDE STATISTIQUE

Durant la période du stage au sein du centre de transfusion sanguine de Fès, du 6 avril au 30 mai 2015, le nombre total des donneurs est de 3557 examinés a révélé six cas positifs de l'infection par l'HCV. Le nombre de donneurs et le pourcentage des cas positifs parmi les 3557 donneurs de la région Fès-boulmane sont donnés par le tableau 3.

Sur un total de 3557 donneurs examinés durant la période du stage, on a trouvé 6 cas positifs soit un taux de (0.17%) et 3551 cas négatifs (99,83 %).

Vu que ces chiffres (Tableau 4) ne présentent pas des résultats significatifs, on a essayé de prendre les résultats précédents enregistrés dans le service.

Le tableau 5 et la figure 10, illustrent la répartition mensuelle de la sérologie HCV positive parmi les 9574 donneurs de sang examinés depuis le 1<sup>er</sup> Janvier jusqu'au 30 Mai 2015. Ainsi que la répartition de ces résultats selon les localités dans la région Fès-boulmane (tableau 6)

**Tableau 3 : Nombre de donneurs et pourcentage des cas positifs parmi les 3557 donneurs testés.**

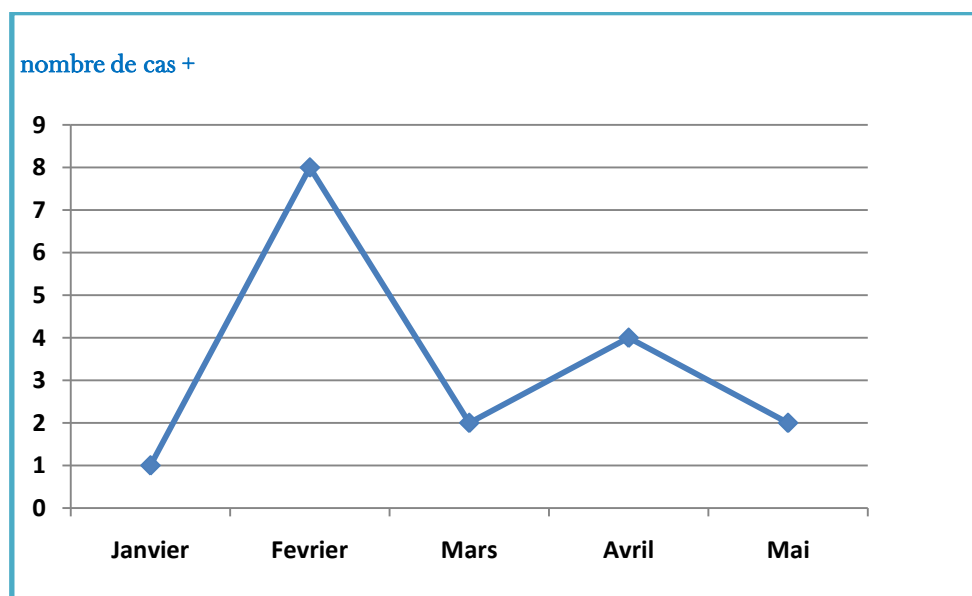
Localité	Nombre de donneurs	Nombre des cas positifs	Pourcentage %
Fès	2879	4	0.14 %
Taza	553	1	0.18 %
Autre	125	1	0.80 %
<b>Total</b>	<b>3557</b>	<b>6</b>	<b>0.17 %</b>

**Tableau 4 : Nombre total et pourcentages des cas positifs et des cas négatifs.**

	Nombre	Pourcentage %
Cas négatifs	3551	99,83 %
Cas positifs	6	0.17%

**Tableau 5 : Répartition mensuelle de la séropositivité de la région Fès-Boulemane(du 1er Janvier au 30 Mai 2015).**

Mois	localité	Nombre de donneurs	Nombre de cas positif
01/2015	Fès	1354	1
	Taza	288	0
	Autre	317	0
02/2015	Fès	1559	6
	Taza	194	2
	Autre	188	0
03/2015	Fès	1811	1
	Taza	236	1
	Autre	130	0
04/2015	Fès	1571	3
	Taza	457	1
	Fès	1308	1
05/2015	Taza	96	0
	Autre	125	1
<b>Total</b>		<b>9574</b>	<b>17</b>

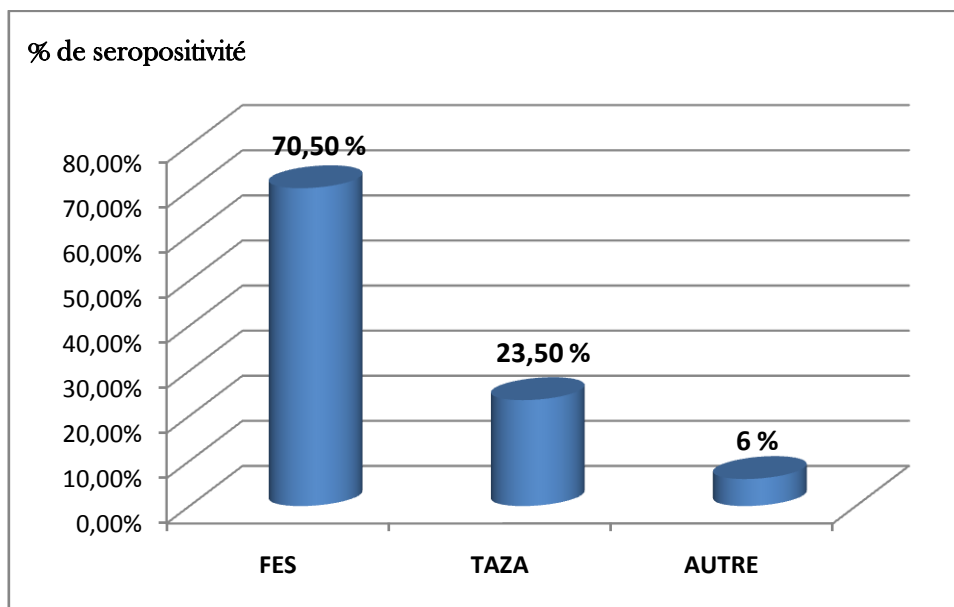


**Figure 10 : Variation des résultats d’HCV+ en fonction des mois.**

**Tableau 6 : Nombre des donneurs et taux des cas positifs  
de chaque localité du 1er Janvier au 30 Mai 2015.**

Localité	nombre de patients	Nombre des cas positifs	Pourcentage %
Fès	7603	12	0,15 %
Taza	1211	4	0,33 %
Autre	760	1	0,13 %
<b>Total</b>	<b>9574</b>	<b>17</b>	<b>0.18 %</b>

Sur un nombre total de 17 cas positifs, la séropositivité a été répartie sur les localités comme suite (figure 11) :



**Figure 11 : Pourcentage de la séropositivité pour chaque localité**

### III- INTERPRETATION

L'étude statistique des tests de dépistage de L'hépatite C, nous permet de donner une estimation approximative de la séropositivité de la population examinée et ne représentent pas la prévalence réelle de l'hépatite C au sein des donneurs de sang du CRTS de Fès ni celle du Maroc en général.

Pour les raisons suivantes :

- L'étude est portée sur une population relativement sélectionnée car les donneurs de sang sont choisis sur la base d'un guide d'entretien médicale. L'échantillon n'est donc pas choisi de manière randomisée.

- Ces résultats sont ceux d'une première détermination faite par ELISA, donc dépistage des anticorps seulement. La séropositivité exacte ne peut être confirmée que par un dépistage génomique viral par (PCR) pour faire écarter les faux positifs et les cas guéris.
- L'échantillon représentatif permettant d'évaluer la prévalence au Maroc doit tenir compte des variations environnementales, et toutes les régions du Maroc doivent y être représentées.

## CONCLUSION GÉNÉRALE

L'hépatite C constitue un redoutable problème de santé publique mondiale par sa prévalence élevée, estimée à 3 % selon l'OMS. Son évolution silencieuse ainsi que sa fréquence élevée du passage à la Chronicité, expliquent l'existence d'un grand réservoir de sujets infectés.

Vu que le centre régional de transfusion sanguine de Fès assure la délivrance des produits sanguins labiles aux malades de la région selon leur besoin et leur pathologie, tout en assurant la sécurité transfusionnelle de point de vue immunologique et sérologique en se basant sur les différents tests réalisés lors de la qualification biologique. Le dépistage de l'hépatite C constitue, parmi autre, un test primordial pour avoir réalisé l'objectif du centre et aussi pour limiter la transmission de cette épidémiologie.

Durant la période de notre stage allant du 06 Avril au 30 Mai 2015 au sein de CRTS Fès, nous avons eu l'occasion de suivre toutes les étapes de dépistage sérologique de l'hépatite C chez les donneurs du sang, depuis la réception des échantillons à tester jusqu'à l'obtention du résultat final.

Sur un nombre élevé des donneurs (3557), la prévalence de l'hépatite C reste faible (6 cas positifs), cela est dû à la bonne sélection médicale lors de la consultation pré-don.

De même ce stage m'a aussi permis de :

- ✓ Compléter les acquis des multiples travaux pratiques, sur le terrain professionnel ;
- ✓ Comprendre le déroulement du travail dans le domaine professionnel ;
- ✓ Savoir les efforts déployés par les CRTS afin de réduire le risque de transmission de l'hépatite C relatif à la transfusion sanguine ;
- ✓ Evaluer la prévalence de l'infection à VHC chez les donneurs de sang du CRTS Fès.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- -Benjelloun S, Bahbouhi B, Sekkat S, Bennani A, Had N, Benslimane A(1996) - Anti-HCV seroprevalence and risk factors of hepatitis C virus infection in Moroccan population groups
- DeniFrançois (1999) -*Les virus transmissibles de la mère à l'enfant* : 105.
- Fabianifrancoiselunel (2006) -*virologie médicale* : 329-338.
- PasquierCrisophe, stéphaneBertagnoli, Frédérique Messud-petit, jacques izopet(2005) -*Virologie humaine et animale* : 182-183.
- Trépo Christian, Philippe Merle, Fabien Zoulim(2006) -*Hépatites virales B et C* p:116.
- [www.who.int](http://www.who.int) « OMS »
- [www.hepatitesressources.com](http://www.hepatitesressources.com)
- [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)
- [www.passeportsante.net](http://www.passeportsante.net)