

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

**U NIVERSITE AMAR TELID J I
LAGHOUAT**



Faculté de sciences

Département de biologie

MASTER 2

Option : biochimie

Des produits naturels

**Etude comparative entre
la methode ELISA et les
tests rapides dans le diagnostic des
infections virales dans le CTS de Laghouat**

Réalise par :

ANTAR sarah

Encadreur

Dr : SIFI Ibrahim

Année universitaire 2017/2018

Dédicace

À mon Père ;

À ma mère;

À mon mari ;

À mes enfants ;

À mon Frère et à mes sœurs ;

À tous mes amis ;

A tous ceux, qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à l'aboutissement de ce travail ;

A Tous ceux qui se battent pour faire avancer la science en Algérie.

Remerciements

Ce travail a été réalisé au laboratoire du Centre de Wilaya de transfusion sanguine de la wilaya de Laghouat –hôpital Ahmida Benadjila- . J'exprime mes profondes gratitudees :

Au Professeur Ibrahim SIFI, mon directeur de mémoire pour avoir guidé mes premiers pas dans la recherche. J'avais bénéficié de son encadrement scientifique et de son soutien moral pour l'intérêt qu'il a porté à mon étude et ses conseils.

À Mr Khaled ELHAMEL pour son aide précieuse au cours des manipulations au laboratoire et pour ses conseils et sa disponibilité.

À toute l'équipe du Laboratoire du Centre de Transfusion Sanguine, et à tous mes collègues pour ces encouragements.

À tous mes promotionnaires qui nous a inspiré force et courage pour avancer dans mes études scolaires et universitaires, Merci.

Liste des abréviations :

Ac : Anticorps.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

Ag : Antigène.

AgHBs : Antigène de l'hépatite B.

ARN : Acide ribonucléique.

CD4 : Classe de Différenciation.

CERBA: Centre de Recherche Biomoléculaire Pietro Annigoni.

CWTS: Centre de Wilaya de Transfusion Sanguine.

D.O : Densité optique.

ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.

Env : Enveloppe.

Gag : Groupe antigène.

Gp: Glycoprotéines

RT/PCR : Reverse Transcriptase/Polymerase Chain Reaction.

Ig: Immunoglobulines.

PSL : Produits sanguins labile.

VHB : Virus de l'hépatite B.

VHC : Virus de l'hépatite C.

VIH/SIDA : Virus de l'Immunodéficience Humaine/ Syndrome de l'Immunodéficience Acquise.

WB : Western Blot.

Liste des figures :

Figure 1 : Virus de l'hépatite B observé en microscopie électronique.

Figure 2 : Organisation du génome du VHB.

Figure 3 : Profil sérologiques des marqueurs de l'hépatite.

Figure 4 : Schéma du VHC.

Figure 5 : Gènes de structures du VHC.

Figure 6 : Schéma du VIH-1.

Figure 7 : Gènes de structures du VIH-1/ 2.

Figure 8 : Cycle de réplication du VIH.

Figure 9 : Apparition d'anticorps après infection et leur détection.

Figure 10 : algorithme de dépistage du VIH.

Figure 11 : Algorithme de dépistage de l'hépatite C.

Figure 12 : Algorithme de dépistage de l'hépatite B.

Figure 13 : Laveur calibrée pour microplaques ELISA.

Figure 14 : Lecteur de microplaques ELISA (spectrophotomètre de plaque).

Figure 15 : Tests de diagnostic rapide.

Figure 16 : Principe du test ELISA sandwich.

Figure 17 : Echantillons réels des tests de diagnostic rapide et test ELISA.

Liste des tableaux :

Tableau 01 : Lieu du don, Sexe, Types de donneurs.

Tableau 02 : Systèmes d'analyses et infections virales.

Sommaire

Dédicace

Remerciement

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Sommaire

Résumé

Introduction.....p.1.

I. Partie bibliographique.....p.4.

I.1 Les infections virales diagnostiquées au niveau des centres de transfusion.....p.5.

I.1.1 Virus de l'hépatite B.....p.5.

I.1.1.1Génome et propriétés structurales.....p.5.

I.1.1.2Infection et aspect immunologique.....p.7.

I.1.1.3Transmission.....p.9.

I.1.1.4Traitement.....p.10.

I.1.2 Virus de l'hépatite C.....p.12.

I.1.2.1Génome et propriétés structurales.....p.12.

I.1.2.2Infection et aspect immunologique.....p.13.

I.1.2.3Transmission.....p.14.

I.1.2.4Traitement.....p.14.

I.1.3 Virus de l'immunodéficience humaine.....p.17.

I.1.3.1Génome et propriétés structurales.....p.17.

I.1.3.2Infection et aspect immunologique.....p.18.

I.1.3.3Transmission.....p.20.

I.1.3.4Traitement.....p.21.

I.2 Diagnostic biologique des infections virales.....p.23.

I.2.1 Les bases de diagnostic sérologiques.....p.23.

I.2.2 Tests de dépistages.....	p.24.
I.2.2.1Tests ELISA.....	p.24.
I.2.2.2Tests simples/rapides.....	p.25.
I.2.3 Tests de confirmation.....	p.26.
I.2.4 Les algorithmes de dépistage des infections virales.....	p.27.
II. Matériel et méthodes.....	p.30.
II.1Cadre de l'étude et déroulement des travaux.....	p.31.
II.2Collecte des échantillons.....	p.31.
II.3 Préparation des échantillons et mises en garde.....	p.31.
II.4Préparation des réactifs et mise en garde.....	p.31.
II.5Matériel utilisés.....	p.32.
II.6Méthodes de diagnostic.....	p.33.
II.6.1Les tests de diagnostic rapide (TDR).....	p.33.
II.6.2Diagnostic par tests ELISA.....	p.35.
II.7 Performances des tests rapides.....	p.38.
III. Résultats et discussion.....	p.40.
III.1. Résultats.....	p.41.
III.1.1. Paramètres des donneurs.....	p.41.
III.1.2. Systèmes d'analyses et les infections virales.....	p.42.
III.1.3. Performances des tests rapides.....	p.44.
III.2 Discussion.....	p.45.
Conclusion et perspectives.....	p.48.

Références bibliographiques

Annexe

Résumé :

Ces dernières années des progrès considérables ont été faits dans le but de garantir aux transfusés une sécurité maximale, C'est l'objectif principale du centre de transfusion sanguine de Laghouat qui fait le dépistage systématique des infections virales (VHB, VHC et VIH). Le CTS de Laghouat utilise principalement test ELISA comme méthodes de diagnostic habituelle de ces infections. Mes ces dernières années des tests rapides sont proposés aussi pour le même dépistage.

L'étude a porté sur une comparaison de ces deux méthodes (test ELISA et tests rapides) sur des plasmas et des sérums provenant de donneurs de sang, afin d'évaluer la performance de ces tests rapides dans le diagnostic des infections virales ou le test ELISA est considéré comme test de confirmation pour les tests rapides.

100 sujets ont été inclus dans notre étude. La majorité des donneurs était jeunes, de sexe masculin dont la majorité est des donneurs réguliers.

Nous avons détecté par les tests rapides 5 échantillons positifs Sur les 100 donneurs (04 cas pour l'hépatite C et 01 un cas pour l'hépatite B). Le test ELISA confirme seulement le cas de l'hépatite B. et absence totale des cas positifs pour le VIH. Ces résultats faible reflète une présence de mesures sanitaires adéquates pour lutter contre les infections virales au niveau de notre région surtout les donneurs de sang.

Mots clés : CWTS, infections virales, ELISA, tests rapides.

Introduction

La sécurité transfusionnelle reste un problème de santé publique majeur dans le monde et demeure un élément clé de la lutte contre les infections virales. Ces dernières années des progrès considérables sont faits pour améliorer la qualité des produits sanguins labiles obtenus dans le processus de transfusion sanguine.

En Afrique, ces améliorations se traduisent par l'introduction du dépistage sérologique systématique des virus du SIDA (VIH-1 et VIH-2) et des hépatites B et C sur les dons de sang, et aussi la recherche de la garantie d'une sécurité maximale en transfusion sanguine qui repose sur des bases suivantes :

- L'organisation des structures, des établissements de transfusion sanguine ;
- L'hémovigilance, qui constitue un système de recueil des données, d'analyses et d'actions d'amélioration ;
- Les bonnes pratiques transfusionnelles à appliquer de manière pragmatique ;
- La formation des acteurs impliqués dans la chaîne transfusionnelle ;
- Le développement des activités de référence et de recherches etc.

De nos jours, le risque de contamination par transfusion du virus du SIDA comme des virus des hépatites B (VHB) et C (VHC) a considérablement diminué grâce à l'application des mesures préventives et à l'amélioration de la sensibilité des réactifs de dépistage sérologique. Cependant, il subsiste un risque résiduel, très faible, mais qui persiste et ce, en dépit des mesures de sélection des donneurs et du dépistage des marqueurs biologiques (antigène ou anticorps). Ce risque résiduel post-transfusionnel est essentiellement lié à la fenêtre sérologique, période qui sépare l'infection de l'apparition des marqueurs sérologiques (anti-VIH, anti-VHC et VHB etc.).

Des mesures ont été adoptées en vue de réduire le risque de transmission des virus majeurs (VIH-1/2, VHB et VHC). La première mesure repose sur une sélection clinique rigoureuse des candidats au don de sang au cours de l'entretien médical. La seconde est l'introduction progressive de nouveaux tests de dépistages dans la qualification biologique du don, qui a contribué à réduire le risque résiduel de façon significative.

Chaque année la demande en poches de sang augmente et on assiste à l'apparition dans la population en générale de nouveaux cas d'infections dus aux maladies transmissibles par voie sanguine. Cette situation impose donc au CWTS (centre de wilaya de transfusion sanguine) de disposer des tests de validation biologique des produits sanguins répondants à des normes internationales afin de réduire la transmission d'un agent infectieux du donneur au receveur.

Le CWTS de Laghouat applique systématiquement la technique ELISA sur les dons de sang pour le dépistage des infections virales. Mais sur le marché des réactifs de nombreux tests de dépistages rapides (tests rapides) sont proposés.

Quelles sont les résultats en termes de performances des ces tests rapides en dépistages précoces des infections virales dans une banque de sang ?est-il possible d'utiliser de tels tests en transfusion sanguine pour la sélection des unités de sang ?

Dans cette étude on va répondre à ces questions en faisant une étude comparative entre la méthode ELISA et les tests rapides, en basant sur les différences entre ces tests en termes de spécificité et de sensibilité.

I- Partie bibliographique

I.1 Les infections virales diagnostiquées au niveau des centres de transfusion :

I.1.1 Virus de l'hépatite B :

L'hépatite B est une hépatite virale due à une infection par le virus de l'hépatite B (VHB) et entraînant une inflammation du foie. Le VHB infecte des millions de personnes à travers le monde. C'est un sérieux problème de santé publique car ces personnes meurent chaque année des causes de cirrhose et de cancer quel'infection par le VHB engendre à long terme (Lok, A. S. (2002))

I.1.1.1 Génome et propriétés structurales :

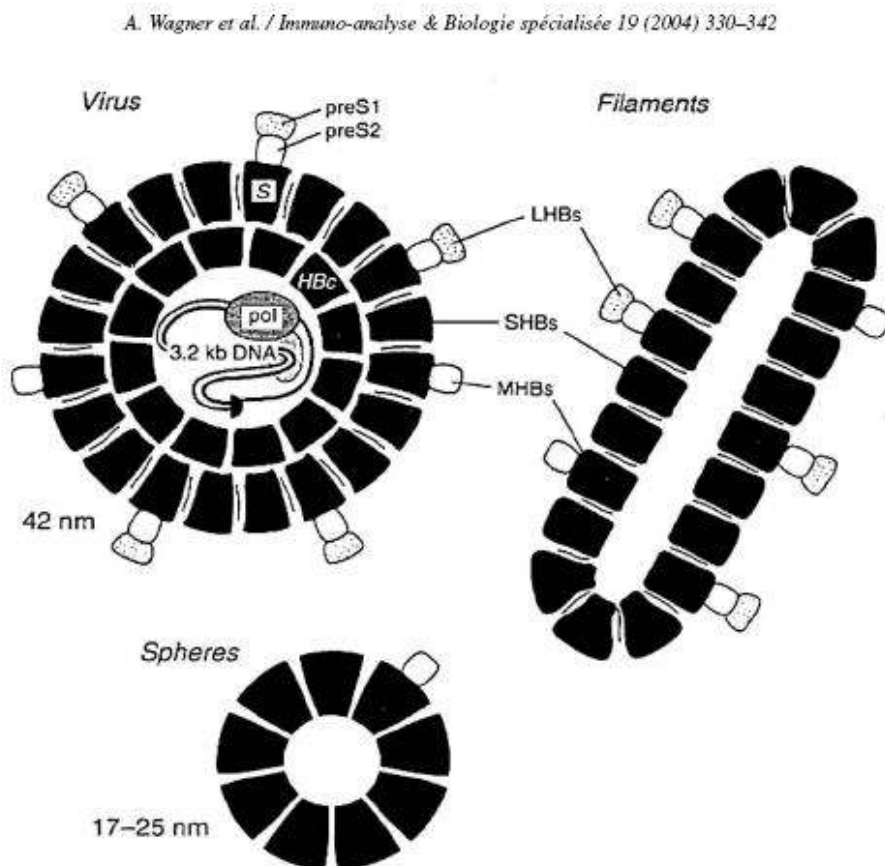


Figure 1 : Virus de l'hépatite B observé en microscopie électronique

Le VHB appartient à la famille des **Hepadnaviridae**. Cette famille regroupe l'ensemble des virus dont le génome est constitué d'un ADN circulaire double brin ou partiellement double brin et possédant une transcriptase inverse (Alter, M. J. (2003)).

En microscopie électronique, le VHB se présente sous trois types de structures :

- Des particules sphériques non infectieuses de 20 nm de diamètre ;
- Des tubules de 200 à 700 nm de long formés de l'empilement des particules sphériques non infectieuses ;

•Des particules infectieuses ou « particules de Dane » de 42 nm de diamètre. Ces particules sont constituées d'une nucléocapside contenant un ADN double brin associé à une ADN polymérase et d'une enveloppe protéique (Alter, M. J. (2003)).

Le génome du VHB est formé d'un ADN circulaire (comprenant 3200 nucléotides) et partiellement double brin sur les deux tiers de sa longueur. Le génome possède un brin long (L-) d'une longueur de 3,2 kb qui est invariable entre les différents mutants, et un brin court (S+) de longueur variable (50% à 100% de la taille du génome). Il existe sur le brin L- du génome, 4 cadres de lectures ouvertes codant pour les protéines du virus (Zeba, T.A. (2012)).

La région S code pour les protéines d'enveloppe regroupant une protéine majeure de surface de 24 kDa (AgHBs) portant le déterminant « a » et qui est la cible des anticorps neutralisants et les protéines préS1 et préS2 (Zeba, T.A. (2012)).

La région C est composée du gène C qui code pour la protéine de capside de 22 kDa et d'une région pré-C codant pour une protéine non structurale de 17 kDa encore appelée AgHBe (Zeba, T.A. (2012)).

La région P code pour l'ADN polymérase virale de 82 kDa et recouvre 80 % du génome. Cette enzyme possède à la fois des activités de transcriptase inverse, d'ADN polymérase ADN-dépendante et de RNase H (Zeba, T.A. (2012)).

La région X code pour un polypeptide de 145 à 154 acides aminés (dépendant du sous-type du virus). Ce polypeptide X est une protéine transactivatrice du génome viral et cellulaire, et est posséd également un potentiel oncogénique (Zeba, T.A. (2012)).

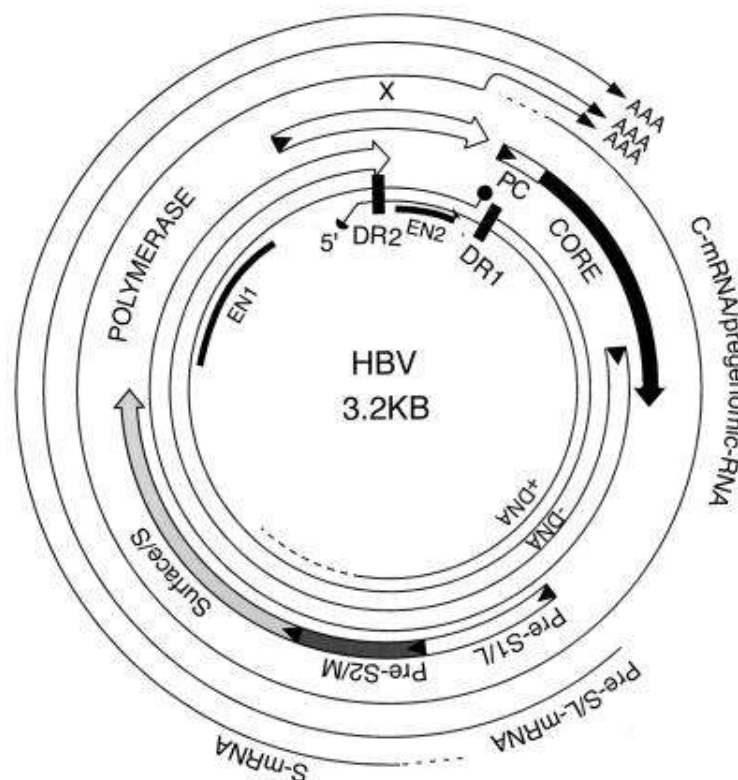


Figure 2: Organisation du génome du VHB

I.1.1.2 Infection et aspect immunologique :

Le diagnostic d'une hépatite virale de type B repose sur la détection de certains marqueurs du VHB dans le sérum ou dans le plasma. Cette détection repose également sur deux types de méthodes : les techniques sérologiques et les techniques de biologie moléculaire (**Benvegno, L., Fattovich, G., Noventa, F., Tremolada, F. et autres (1994)**).

- Les marqueurs directs du VHB :

•L'antigène HBs (AgHBs) :

Exprimé à la surface de la particule virale, l'AgHBs est la structure d'attachement du virus sur la cellule cible. Cet antigène constitue l'essentiel de l'enveloppe du virus. Contrairement à la plupart des virus enveloppés, l'enveloppe du VHB ne dérive pas du bourgeonnement des membranes nucléaires ou cytoplasmiques, mais est plutôt constituée au niveau de la membrane cytoplasmique de l'hépatocyte, associant à l'antigène HBs des molécules de glycoprotéines et de lipides cellulaires. Cette structure particulière de son enveloppe confère une résistance au VHB, à l'instar des virus « nus ». En effet, contrairement aux « virus à enveloppe classique », le VHB résiste à l'éther et à la dessiccation (des sérums laissés 6 mois à 30-32°C restent infectieux). Il faut pour l'inactiver dans le sérum, une concentration d'hypochlorite de soude de 5 % (eau de Javel pure), alors que d'habitude la plupart des virus sont détruits par l'hypochlorite de soude à 0,5 % (**Benvegno, L., Fattovich, G., Noventa, F., Tremolada, F. et autres (1994)**).

L'AgHBs est le marqueur viral le plus recherché dans le sérodiagnostic de l'hépatite B. C'est également le premier marqueur qui apparaît au cours de l'infection et est détectable six mois dans le sérum par la plupart des techniques immunoenzymatiques, avant d'être éliminé par le sujet infecté. Cependant, des mutations affectant l'AgHBs peuvent le rendre indétectable par les tests sérologiques. La présence de l'AgHBs au-delà de six mois traduit une hépatite B chronique (**Benvegno, L., Fattovich, G., Noventa, F., Tremolada, F. et autres (1994)**).

•L'antigène HBc (AgHBc) :

Il constitue le core (ou la capsid) et est exprimé à la surface des hépatocytes où il induit des réactions de cytolysse de la part des lymphocytes T CD8+. Il n'est pas détectable dans le sérum mais peut être mis en évidence dans le noyau des cellules hépatiques (**Bartholomeusz, A. et S. Schaefer, (2004)**).

•L'antigène HBe (AgHBe) :

Il est comme l'AgHBc, codé par le gène C, mais diffère de celui-ci par l'absence de 34 à 36 acides aminés à son extrémité carboxy-terminale et par la présence de 10 acides aminés dans sa région pré-C. Sa présence dans le sérum traduit une répllication active du VHB. Ce marqueur est important dans le suivi de l'hépatite B chronique (**Bartholomeusz, A. et S. Schaefer, (2004)**).

•**L'ADN du VHB :**

Dans le suivi des patients chroniquement infectés, la charge virale est un outil standard dans l'évaluation de la réponse au traitement. L'ADN du VHB est quantifiable dans le plasma par les techniques de polymérisation en chaînes comme la PCR en temps réel ou par les techniques d'hybridation. Toutefois, quelque soit la technique utilisée, l'expression des résultats en unités internationales par millilitre (UI/mL) est indispensable afin de standardiser et de comparer les résultats des examens réalisés dans les différents laboratoires. De plus, dans le cas des hépatites occultes où l'AgHBs muté n'est pas détectable par la plupart des anticorps monoclonaux, la recherche qualitative de l'ADN est importante.

La recherche du génotype viral par les techniques de biologie moléculaire est aussi un facteur important dans le suivi des infections chroniques (**Benvegnu, L., Fattovich, G., Noventa, F., Tremolada, F. et autres (1994)**).

- **Les marqueurs indirects :** (voir figure 3)

•**Les anticorps anti-HBs (AcHBs) :**

Ils apparaissent après la disparition de l'AgHBs. Leur présence dans le sérum traduit une élimination du virus par l'hôte infecté ou, une immunisation par la vaccination (**Bartholomeusz, A. et Schaefer, S.(2004)**).

•**Les anticorps anti-HBe (AcHBe) :**

Leur apparition dans le sérum traduit une régression, ou un arrêt de la réplication. La séroconversion de l'AgHBe est aussi un bon pronostic dans le traitement des patients avec une hépatite chronique B active, le but de celui-ci étant de parvenir à une charge virale indétectable (**Bartholomeusz, A. et Schaefer,S.(2004)**).

•**Les anticorps anti-HBc (AcHBc) :**

L'AcHBc est avec l'AgHBs, le marqueur le plus couramment utilisé dans le dépistage de l'hépatite B, notamment en transfusion sanguine. L'AcHBc peut persister dans le sérum quelques temps après la disparition de l'AgHBs (**Bartholomeusz, A. et Schaefer, S. (2004)**).

Le stade de l'infection par le VHB dépend de l'interprétation du profil des marqueurs sérologiques (**Alter, M. J. (2003)**).

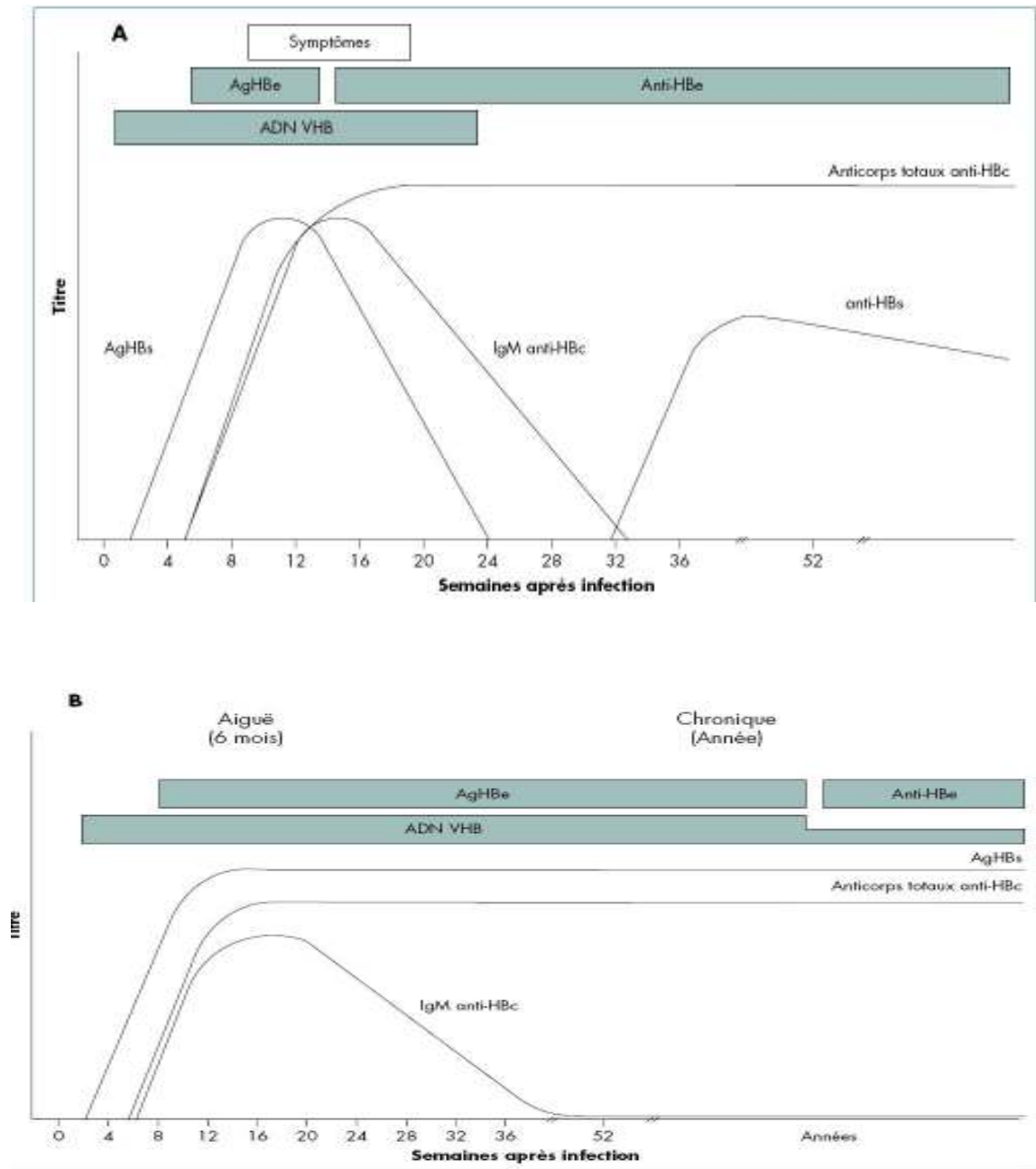


Figure 1. Cinétiques des marqueurs virologiques au cours des infections par le VHB : A) infection aiguë B ; B) infection chronique B.

Figure 3 : Profil sérologiques des marqueurs de l'hépatite

I.1.1.3 Transmission :

Le VHB se transmet par contact avec les fluides corporels (liquides et sécrétions biologiques) infectés, et l'Homme est son seul hôte naturel. Les modes de transmission reflètent la prévalence du virus de l'hépatite B dans une zone donnée. Les voies possibles de transmission identifiées sont (**Bartholomeusz, A. et Schaefer, S. (2004)**) :

- **La transmission par voie sexuelle** : c'est une source majeure de contamination du VHB dans le monde en général et la principale source d'infection dans les zones de faible endémicité. L'hépatite B est considérée comme une maladie sexuellement transmissible. Dans certains pays où la prévalence du VHB est faible comme aux Etats-Unis et en Europe de l'Ouest, la transmission par voie sexuelle représente en général plus de 40% des nouvelles infections dont plus de 70% chez les homosexuels (**Alter, M. J. (2003)**).

- **La transmission par voie parentérale**: ce mode de transmission regroupe les injections de drogues par voie intraveineuse avec des seringues souillées et les actes médicaux non sécurisés (transfusion sanguine, injections, acupuncture, soins dentaires). D'autres pratiques telles que le partage intrafamilial d'objets tranchants (rasoirs, brosses à dents, coupe-ongles), les tatouages et les mutilations génitales sont également associées à ce mode de transmission. Une sensibilisation et une éducation sanitaire sur les risques liés au VHB permet en principe de prévenir la transmission de ce virus par voie parentérale (**Alter, M. J. (2003)**).

- **La transmission verticale**: c'est la transmission du virus d'une mère infectée à sa progéniture en l'absence de toute mesure préventive. Ce mode de contamination est caractéristique des régions où la prévalence du VHB est élevée. La transmission verticale du VHB peut survenir *in utero*, pendant ou après l'accouchement. Dans ce cas, le risque de contraction du virus est élevé (environ 90%) et semble corrélé à la charge virale maternelle et à la cinétique de répllication du virus. Cependant, contrairement à la transmission verticale du VIH, l'accouchement par césarienne ne réduit pas la transmission mère-enfant du VHB (**Alter, M. J. (2003)**).

- **La transmission nosocomiale** : elle peut survenir d'un patient à un autre patient, d'un patient à un membre du personnel soignant ou *vice versa*. Ce mode de transmission peut être prévenu par l'application de certaines mesures telles que la stérilisation efficace du matériel médical et la vaccination de tout le personnel de santé (**Alter, M. J. (2003)**).

I.1.1.4 Traitement :

La plupart des adultes immunocompétents et infectés par le VHB n'ont en général pas besoin de traitement car, éliminant spontanément le virus après six mois. Toutefois, des traitements sont disponibles pour les individus chroniquement infectés et ceux à risque de développer une hépatite fulminante. Ces traitements n'éliminent pas le virus mais, ont pour but d'inhiber sa multiplication en ralentissant ainsi la progression de la maladie. Deux types de molécules sont proposés : des analogues d'antiviraux nucléosidiques et nucléotidiques qui peuvent

directement inhiber la réplication de l'ADN viral et l'interféron α capable de moduler aussi bien la réponse immunitaire que la multiplication virale (Zeba, T. A. (2012)).

Toutefois, Le choix d'initier un traitement contre le VHB dépend de plusieurs facteurs :

- Une charge virale élevée (10^4 copies d'ADN viral par ml) ;
- Une augmentation des transaminases sériques ;
- Un état de fibrose ou de cirrhose avancé ;
- Une réactivation de la réplication virale due à une immunosuppression.

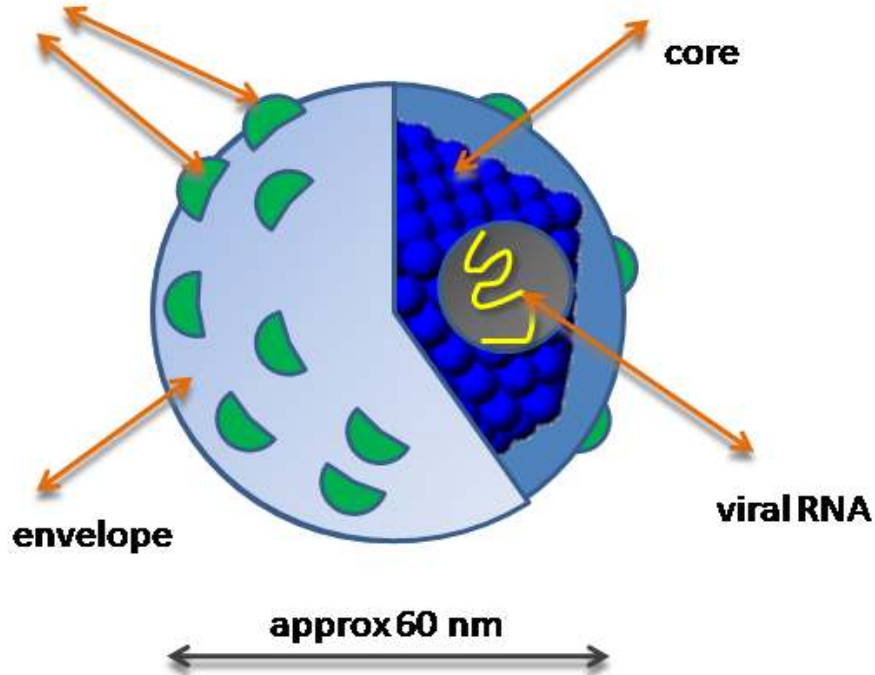
La réponse au traitement dépend également du génotype en cause dans l'infection. Ainsi, une meilleure réponse à l'interféron est obtenue pour les génotypes A et B que pour les génotypes C et D. Aussi, les individus infectés par le génotype B répondent mieux au traitement par la lamivudine que ceux infectés par le type C (Zeba, T.A. (2012)).

I.1.2 Virus de l'hépatite C :

Le virus de l'hépatite C a été décrit en 1989 comme principal agent responsable des hépatites non-A non-B, après identification par des techniques de biologie moléculaire. L'hépatite C représente un important problème de santé publique, c'est une des principales causes de transplantation hépatique. Un tiers de la mortalité par cirrhose et cancer primitif du foie serait lié à l'hépatite C (Nubling, C.M., Willkommen, H. et Lower, J. (1995)).

I.1.2.1 Génome et propriétés structurales :

envelope glycoproteins



Structure of Hepatitis C Virus

Figure 4 : Schéma du VHC

Le VHC (virus de l'hépatite C) est un virus enveloppé de 55 à 65 nm de diamètre. L'enveloppe, porteuse des protéines virales E1 et E2, contient une capsidie de symétrie icosaédrique qui protège un ARN monocaténaire. Il appartient à la famille des *Flaviviridae*, qui regroupe le genre *Flavivirus*. le VHC est classé dans un troisième genre, celui des *Hepacivirus*, dont il est le seul représentant (Poveda, J. (2003)).

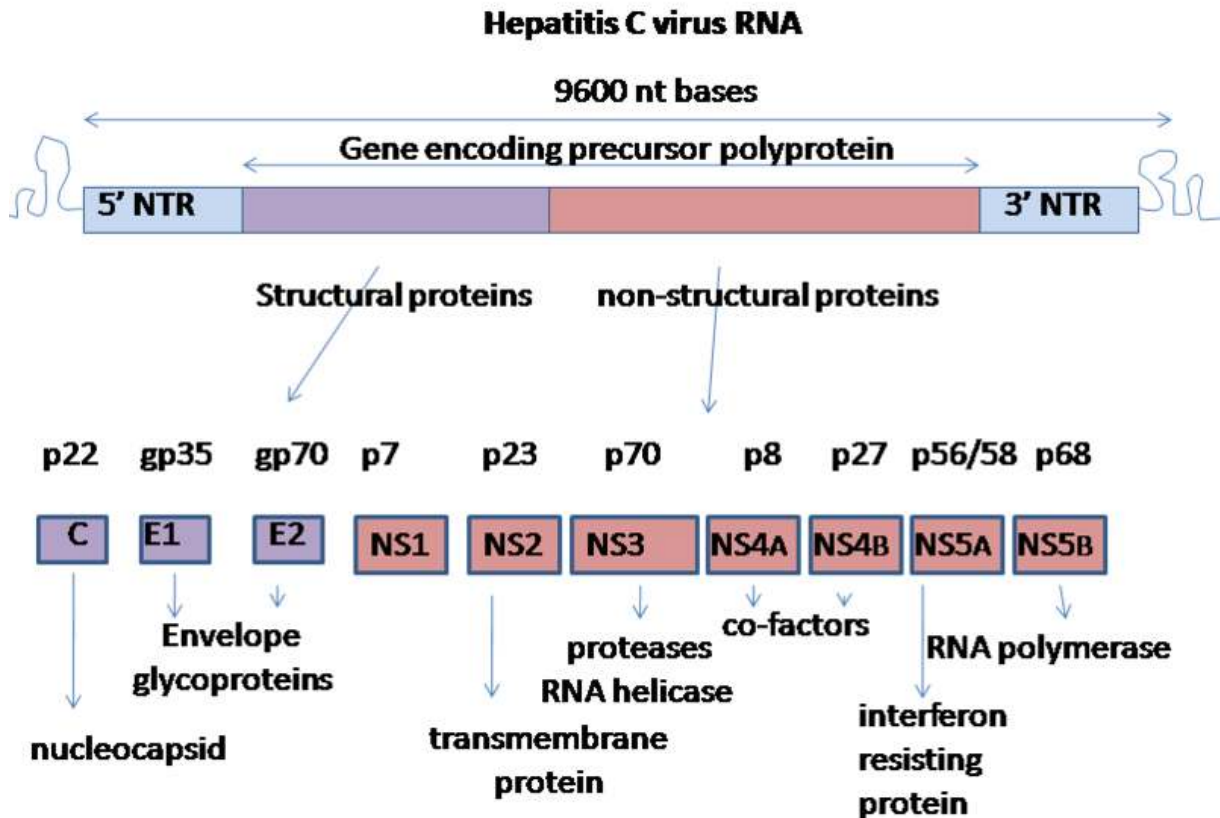


Figure 5 : Gènes de structures du VHC

Le VHC présente une variabilité génétique importante qui a permis de définir des génotypes (80% d'homologie) et de les classer secondairement en sous-types (90% d'homologie). Six génotypes principaux ont été décrits, numérotés de 1 à 6 avec un certain nombre de sous-types, identifiés par une lettre minuscule (1a, 1b etc.) (Poveda, J. (2003)).

I.1.2.2 Infection et aspect immunologique :

Après une incubation de 4 à 12 semaines, l'infection par le VHC provoque une hépatite aiguë souvent bénigne, le plus souvent asymptomatique (90% des cas). L'élévation des transaminases est constante, mais les formes ictériques sont rares. Il n'y a pas de formes fulminantes. 25% à 30% des hépatites C aiguës guérissent spontanément. Ce chiffre est plus élevé chez l'enfant. Dans environ 70% des cas, l'hépatite aiguë évolue vers la chronicité, avec une évolution plus ou moins rapide vers la fibrose, associée à des désordres immunitaires. L'évolution vers la cirrhose concerne environ 20% des patients après 10 ans d'évolution. Une contamination après l'âge de 40 ans, une consommation excessive de l'alcool et le sexe masculin sont des facteurs de risque accru d'évolution vers la cirrhose (Durand, F., Danic B., Tardivel, R., et autres (2000)).

Les anticorps anti-VHC apparaissent environ 10 semaines après le contage, au moment de l'hépatite aiguë ou quelques semaines plus tard (Durand, F., Danic B., Tardivel, R., et autres (2000)).

En cas de guérison d'une hépatite C, après une hépatite aiguë (30% des cas) ou après un traitement efficace, les anticorps peuvent diminuer, voire devenir indétectables. Cette diminution semble fonction de la durée de la multiplication virale avant son arrêt et de la réponse immunitaire individuelle. Par ailleurs, les anticorps peuvent être absents lors d'une véritable hépatite C chronique chez des patients produisant peu d'anticorps : hémodialyses, immunodéprimés. Dans ce cas, l'hépatite C ne pourra être démontrée que par la détection de virus (Poveda, J. (2003)).

I.1.2.3 Transmission :

La transmission du VHC est parentérale dans au moins 60 à 70% des cas. Les deux principaux modes de transmission sont la transfusion sanguine, avant le test systématique des dons, et la toxicomanie par voie intraveineuse, par échange de seringues ou de produits contaminés (Nubling, C.M., Wilkommen, H. et Lower, J. (1995)).

La transmission sexuelle du VHC est possible, mais rare. Seuls 3 à 6% des partenaires réguliers de sujets infectés par le VHC ont eux même des marqueurs d'infection (Nubling, C.M., Wilkommen, H. et Lower, J. (1995)).

La transmission intra-familiale semble possible au vu de la prévalence plus élevées des Ac anti-VHC chez les membres de la famille des patients infectés. Le mécanisme de cette transmission, encore inconnu, pourrait être lié à un mode parental, par partage d'objets potentiellement en contact avec le sang, tels rasoir, brosse à dents, ciseaux... (Nubling, C.M., Wilkommen, H. et Lower, J. (1995)).

La transmission mère-enfant a été démontrée. Elle est fréquente (20%) en cas de co-infection VHC-VIH, et rare (autour de 3%) chez les mères non infectées par le VIH. Ce risque est d'autant plus élevé que la charge virale circulante maternelle en ARN VHC est élevée. La transmission serait plutôt périnatale (Nubling, C.M., Wilkommen, H. et Lower, J. (1995)).

La transmission par l'allaitement n'a pas été démontrée mais ne peut pas être totalement exclue (Nubling, C.M., Wilkommen, H. et Lower, J. (1995)).

Les populations à risque élevé d'infection sont actuellement les polytransfusés, les transplantés, les hémophiles, les toxicomanes et le personnel de santé (Poveda, J. (2003)).

I.1.2.4 Traitement :

Les indications du traitement reposent sur l'évaluation histologique du foie, pondérée par des facteurs individuels altération de la qualité de vie, comorbidités, manifestations extra-hépatiques. La motivation du patient et de son entourage entre aussi en ligne de compte. Ces traitements ne sont en effet pas sans effets secondaires, parfois invalidants (Poveda, J. (2003)).

Un traitement associant IFN-PEG (InterferonPegylé) et ribavirine est proposé en priorité :

- Aux patients atteints d'hépatite chronique modérée sévère ;
- Ou n aux patients atteints de cirrhose ;
- Aux patients rechuteurs ou non répondeurs à une monothérapie par interféron ;
- Aux patients transplantés pour cirrhose ou CHC liés au VHC.

Ces indications peuvent être modulées en fonction de la consommation chronique d'alcool, de l'usage de drogues, d'une co-infection VHC-VIH, ou de l'existence de troubles psychiatriques :

- Une bithérapie de 24 semaines est proposée aux patients infectés par un génotype 2 ou 3 ;
- Une bithérapie de 48 semaines est proposée aux patients infectés par un génotype 1,4,5 ou 6 ;
- Le traitement pourra être arrêté après 12 semaines en cas de non-réponse pour les génotypes 1.

Le traitement des patients atteints d'une hépatite chronique minime ou avec transaminases normales n'est pas recommandé, sauf en cas de manifestations extra-hépatiques (vascularités) (Poveda, J. (2003)).

Les hépatites aiguës peuvent bénéficier d'un traitement identique avec un pourcentage important de succès, sans passage à la chronicité (Poveda, J. (2003)).

- Bilan pré-thérapeutique :

Le bilan de fibrose hépatique repose classiquement sur la ponction biopsie hépatique (PBH) et l'histologie du foie. Il n'y a pas de lien entre quantité d'ARN circulant mesurée et sévérité des lésions hépatiques constatées par l'histologie d'une PBH. Fibrose et activité nécrotico-inflammatoire peuvent également être évaluées par la mesure de marqueurs chimiques sériques indirects ou par le calcul d'index de fibrose ou d'activité. On peut citer entre autres :

- Le Fibrotest, index de fibrose hépatique mesuré à partir des concentrations sériques de la bilirubine totale, des γ -glutamyl-trnspeptidases, de l'haptoglobine, de l'apolipoprotéine A1 et de l'c'-2-macroglobuline en utilisant des techniques validées;
- L'Actitest, estimation de l'activité nécrotico-inflammatoire hépatique établie à partir de 6 paramètres : les cinq précédents auxquels s'ajoutent les transaminases ALAT.

La mesure de ces index, bien corrélée à l'histologie, pourrait permettre d'éviter 50 % des biopsies hépatiques.

Le bilan virologique repose sur la quantification la charge virale circulante en ARN du VHC et sur la détermination du génotype du VHC en cause.

• **Quantification de l'ARN du VHC :**

Elle utilise des techniques d'amplification de la cible (PCR quantitative Monitor HCV de Roche) ou d'amplification du signal après hybridation (ADN branché ou bDNA, Versant HCV de Bayer). Les seuils de sensibilité de ces deux réactifs sont comparables 600 UI/ml pour la PCR, 615 UI/ml pour l'ADN branché. Les deux techniques ont été standardisées vis-à-vis d'un standard international fourni par l'OMS et les résultats sont rendus en Unités Internationales par ml (UI/ml) et directement comparables entre eux.

Cette recherche est toujours réalisée sur sérum. Comme pour la recherche qualitative, le sang doit être décanté très rapidement. La quantification est techniquement possible sur plasma, mais le résultat est différent de celui mesuré sur sérum et ne permettra pas un suivi correct (Poveda, J. (2003)).

La quantification de l'ARN du VHC est indiquée lors du bilan virologique pré-thérapeutique, associée à la détermination du génotype viral. Cette mesure permet d'évaluer le risque de bonne ou mauvaise réponse, et de disposer d'un niveau de base utile pour un suivi sous traitement. Il a été montré qu'un haut niveau de charge virale est corrélé à un risque plus important de transmission mère enfant. Par ailleurs, une charge virale en ARN VHC supérieure à 800.000 UI/ml est considérée comme un facteur de moins bonne réponse et de rechutes plus fréquentes dans le cas du traitement des génotypes 1 en monothérapie par l'interféron α (Poveda, J. (2003)).

• **Sérotypage - génotypage du VHC :**

Le test de sérotypage détermine la spécificité des anticorps circulants. Ce test de compétition pour des antigènes spécifiques permet de déterminer le type mais pas le sous-type. Sa sensibilité n'est que d'environ 80%. Cette situation est fréquente chez l'immunodéprimé ou l'hémodialysé mais se rencontre aussi chez l'immunocompétent. Son principal intérêt réside dans la détermination du type viral alors que la PCR est déjà négative en début de traitement (Poveda, J. (2003)).

Le test de génotypage permet de déterminer le type et le sous-type viral en cause. La détermination du sous-type n'a plus maintenant qu'un intérêt épidémiologique. Les techniques de génotypage permettent de détecter d'éventuelles co-infections par des VHC de types ou de sous-types différents. Cette situation, peu fréquente, est rencontrée chez les multi transfusés et les toxicomanes par voie intraveineuse (Poveda, J. (2003)).

I.1.3 Virus de l'immunodéficience humaine :

Le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) est une maladie infectieuse d'origine virale se traduisant par un déficit profond de l'immunité cellulaire. Il est dû au VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine)(Nagalo, B.M. (2010)).

I.1.3.1 Génome et propriétés structurales :

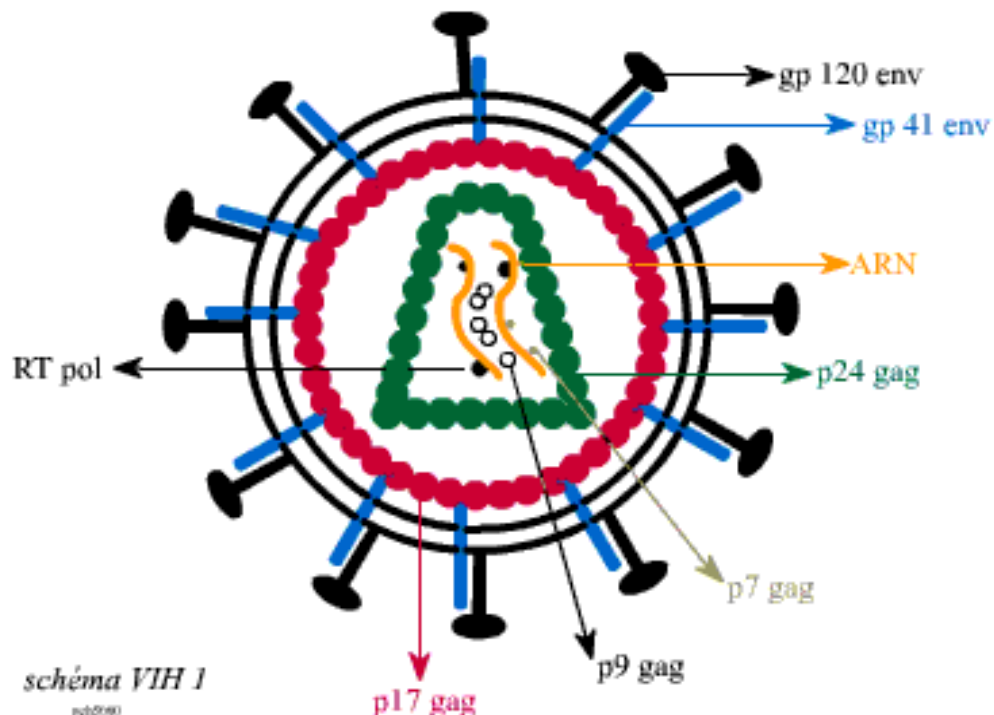


Figure 6 : Schéma du VIH-1

La structure du VIH comprend de l'intérieur vers l'extérieur (figure2) :

- Une enveloppe constituée de glycoprotéines **gp120**, **gp41** et d'une double couche de phospholipides;
- Une matrice formée de glycoprotéines **gp17**;
- Une capside constituée de glycoprotéines **gp24**.

Le virus possède trois gènes codants pour les différentes protéines virales: **Gag** (groupe antigène) qui code pour des protéines de la capside, **Pol** (polymérase) qui code pour des enzymes nécessaires à sa réplication, **Env**(enveloppe) qui code pour des glycoprotéines. Les

gènes *gag*, *pol*, *env* sont régulés par des séquences terminales répétitives Long Terminal Repeat (LTR) qui sont créés lorsque la transcriptase reverse synthétise l'ADN proviral (Nagalo, B.M. (2010)).

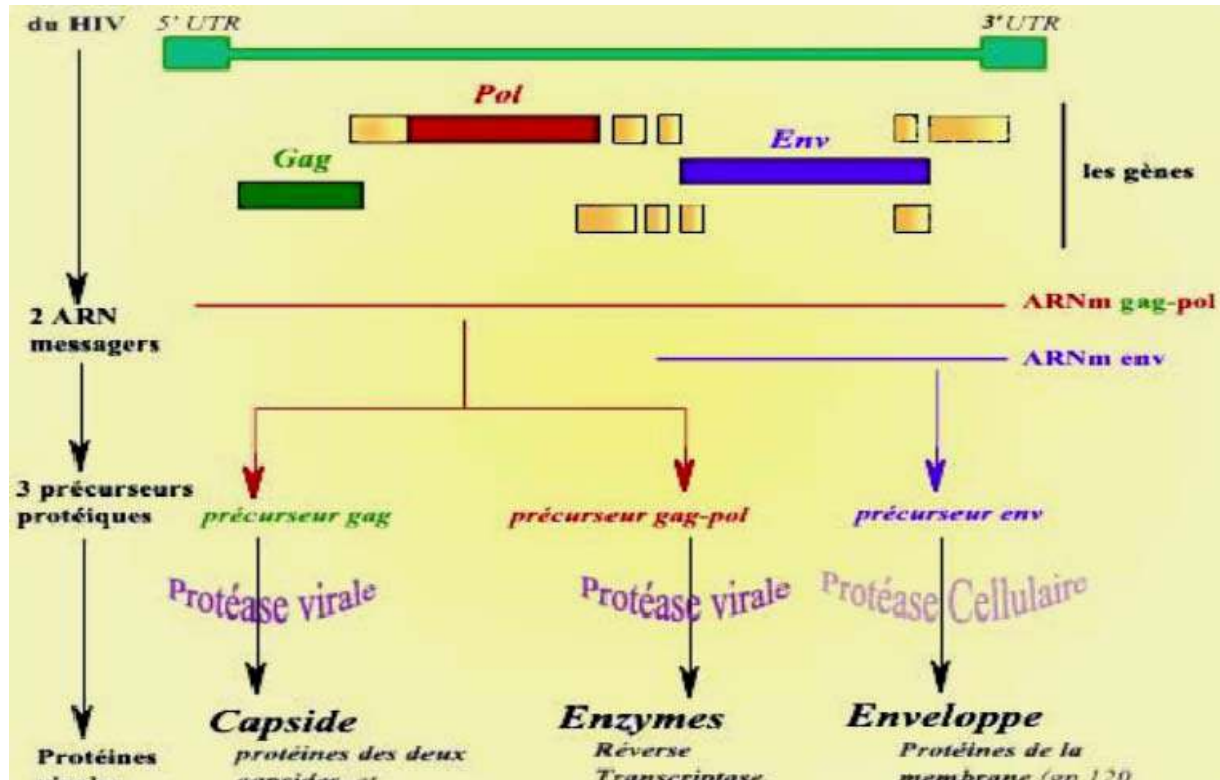


Figure 7: Gènes de structures du VIH-1/2

I.1.3.2 Infection et aspect immunologique :

Le VIH infecte les cellules qui expriment à leurs surfaces une molécule particulière appelé récepteur CD4. Le récepteur CD4 présente une haute affinité pour la molécule gp120. Dans le mécanisme de l'infection le virus se lie à celle-ci grâce à la glycoprotéine de surface gp120, au niveau d'une porte d'entrée composée du récepteur CD4 ainsi que des co-récepteurs appartenant à la famille des récepteurs de chimiokines, dont les principaux sont le CXCR4 et le CCR5 (Chaplain, C. et Belan A. G. (2006)).

Le virus du SIDA s'attaque préférentiellement aux cellules T CD4 même s'il peut s'attaquer à d'autres types de cellules comme les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques (THEZE, 2008). Pendant l'infection le nombre de cellules possédant le récepteur CD4 chute progressivement et cette réduction indique la phase SIDA de la maladie (immunodéficience profonde). La mesure du taux de CD4 pendant la maladie sert à indiquer la gravité de l'infection (Chaplain, C. et Belan A. G. (2006)).

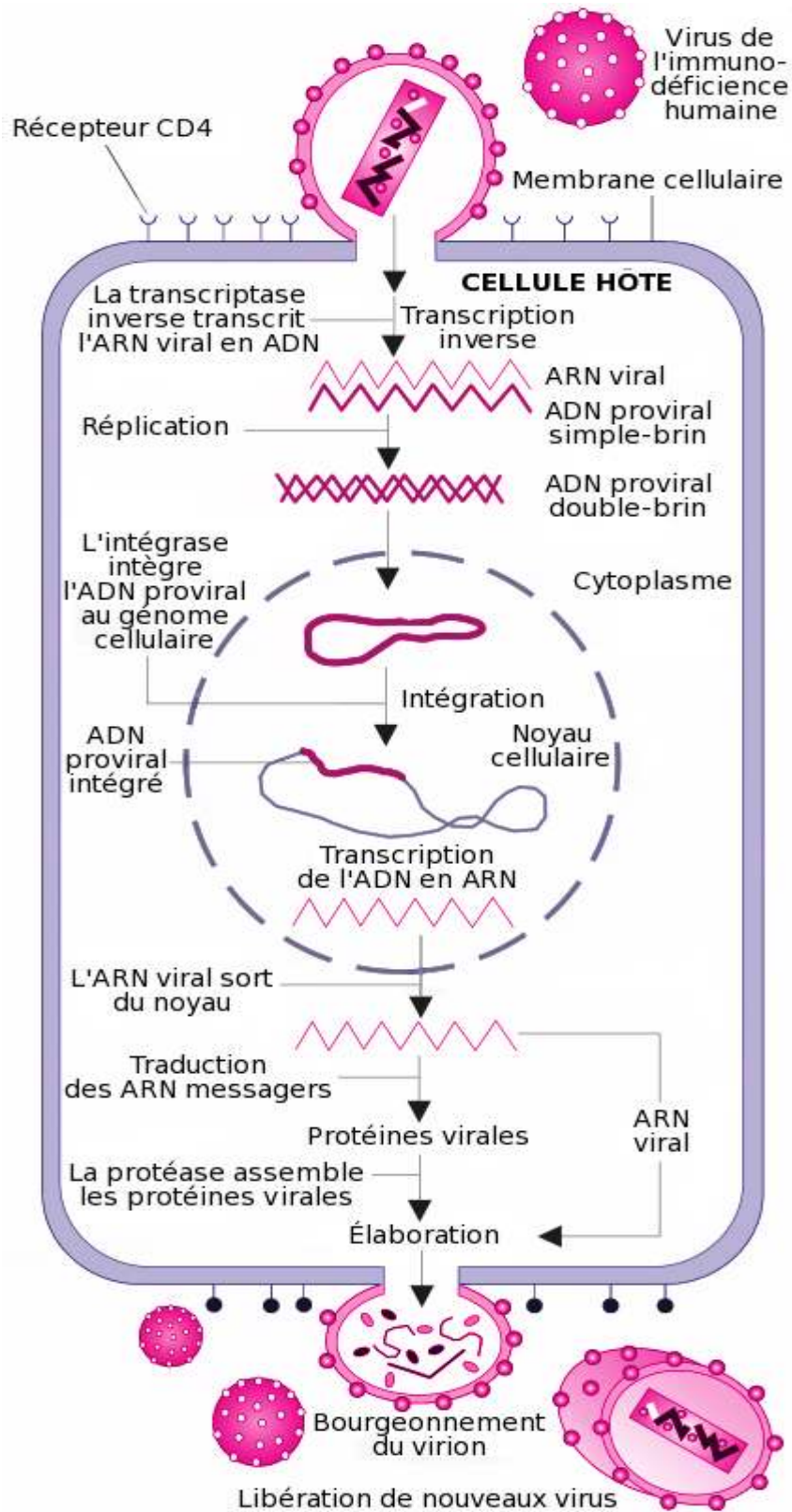


Figure 8 : Cycle de répliation du VIH.

Le virus se fixe sur le lymphocyte T CD4, par reconnaissance entre la protéine virale gp120 et la protéine CD4 du lymphocyte (ainsi qu'un co-récepteur) .Les deux membranes (du virus et du lymphocyte) fusionnent, ce qui permet la pénétration de la nucléocapside (les deux capsides + le matériel génétique, etc.) du virus dans le cytoplasme (Chaplain, C.etBelan A. G. (2006)).

Les deux capsides se dissocient, libérant l'ARN viral dans le cytoplasme. Grâce à la reverse transcriptase virale, l'ARN viral est rétrotranscrit en ADN proviral. Cet ADN pénètre dans le noyau, où il s'intègre au génome du lymphocyte. Il est ensuite transcrit en ARN (Chaplain, C. et Belan A. G. (2006)).

Après avoir été transcrits par l'ARN polymérase de la cellule, les ARN messagers viraux sont traduits en trois précurseurs protéiques. Ces précurseurs sont clivés par des protéases, pour donner les différentes protéines virales. Les protéines virales et l'ARN viral sont associés pour former de nouvelles particules virales infectieuses. Les protéines virales membranaires sont intégrées à la membrane du lymphocyte. Le virus bourgeonne, emportant un fragment de la membrane plasmique du lymphocyte sur laquelle sont intégrées les protéines membranaires virales. Les nouveaux virus sont libérés dans le milieu intérieur. Ils peuvent infecter de nouveaux lymphocytes T4 (Chaplain, C. et Belan A. G. (2006)).

- Réaction immunitaire de l'hôte face à l'infection :

Après la contamination le virus est détectable sous sa forme d'acide ribonucléique (ARN) dès le 10-12e et sous sa forme d'antigène P24 représentant juste une fraction du virus, vers le 12-14e jour. Les premiers anticorps sont détectables dès le 21e jour. La cinétique d'apparition des anticorps anti-VIH varie en fonction de chaque patient et aussi de la souche infectante. L'hôte infecté peut réagir soit par l'immunité non spécifique, constituée de barrières naturelles à l'infection comme la phagocytose par les neutrophiles et les macrophages. Soit également par l'immunité spécifique à travers l'immunité cellulaire assurée par les lymphocytes T ; et de l'immunité humorale assurée par les lymphocytes B (Nagalo, B.M. (2010)).

I.1.3.3 Transmission :

Il existe trois modes de transmission du VIH :

- La transmission sexuelle, par contact entre les muqueuses vaginale, rectale, buccale et les sécrétions sexuelles ou du sang contaminé (Bouvet, E.etRouveix, E. (2005)) ;
- La transmission par voie sanguine, par partage de matériel d'injection de drogues contaminé, lors d'accidents d'exposition au sang ou par transfusion de sang contaminé (Bouvet, E.etRouveix, E. (2005)) ;
- La transmission materno-foetale in utero par passage transplacentaire, pendant l'accouchement par exposition au sang et aux sécrétions vaginales ou ingestion de sécrétions ou après la naissance par allaitement maternel (Bouvet, E.etRouveix, E. (2005)).

I.1.3.4 Traitement :

Les antirétroviraux constituent l'arsenal thérapeutique contre le VIH, qui s'étoffe progressivement. Ils ont pour but d'interférer sur différents mécanismes, d'une part sur les enzymes du VIH nécessaires à sa réplication et d'autre part sur ses mécanismes d'entrée dans la cellule. L'objectif du traitement antirétroviral est de réduire au maximum la réplication du virus pour le rendre indétectable dans le plasma (Tubiana, et autres (1997)), soit l'obtention d'une charge virale plasmatique inférieure au seuil de détection, en général < 50 copies/ml (Launay, (2008)) conduisant ainsi à une restauration immunitaire par l'augmentation du taux de lymphocytes T CD4 et l'amélioration de leur fonction. Les antirétroviraux sont classés suivant leur domaine d'action (Nagalo, B.M. (2010)).

- Inhibiteurs de la transcriptase inverse :

Les inhibiteurs de la transcriptase inverse empêchent la synthèse d'ADN proviral à partir de l'ARN viral. On trouve dans cette classe :

•Inhibiteurs nucléosidiques de la Transcriptase Inverse (INTI) :

Les INTI ont constitué la première classe d'antirétroviraux mis sur le marché en 1985. "Ce sont des prodrogues" devant être phosphorylés.

Pour conduire à des dérivés actifs sur la transcriptase inverse. Ils comprennent la Zidovudine (AZT), la Didanosine (ddI), la Zalcitabine (ddC), la stavudine (d4T), la lamivudine (3TC), l'Abacavir (ABC) et l'Emtricitabine (FTC) (Nagalo, B.M. (2010)).

•Inhibiteurs non nucléosidiques de la Transcriptase Inverse (INNTI) :

Les INNTI sont des inhibiteurs puissants et très sélectifs de la transcriptase inverse du VIH. Leur particularité est qu'ils n'ont pas besoin d'être métabolisés pour inhiber la transcriptase inverse du VIH. Ils ne sont pas actifs sur le VIH2 et le groupe O du VIH1. On trouve dans cette classe la Nevirapine (NVP) et l'Efavirenz (Nagalo, B.M. (2010)).

•Analogues nucléotidiques

Les analogues nucléotidiques comme le Ténofovir qui a été mis sur le marché en 2002, sont des composés de synthèse organophosphorés. Ils s'incorporent sous leur forme triphosphorylée, à la chaîne d'ADN en formation lors de la transcription de l'ARN du virus et en bloquent l'étape finale (Nagalo, B.M. (2010)).

- Inhibiteurs de la protéase (IP)

Les inhibiteurs de la protéase (IP) agissent en inhibant l'action de la protéase virale qui permet le découpage et l'assemblage des protéines virales, processus indispensable à l'obtention de virus infectieux. On obtient alors des virions incapables d'infecter de nouvelles cellules. Les IP sont actifs sur le VIH-1 et le VIH-2. Quatre inhibiteurs de la protéase sont actuellement utilisés dans le traitement du VIH : le saquinavir (Invirase), le ritonavir (Norvir), l'indinavir (Crixivan) et le nelfinavir (Viracept) (Nagalo, B.M. (2010)).

-Inhibiteurs d'intégrase

Ces inhibiteurs bloquent l'action de l'intégrase et empêchent ainsi le génome viral de se lier à celui de la cellule cible. (Exemples: Raltégravir, Elvitégravir) (Nagalo, B.M. (2010)).

-Inhibiteurs de fusion (IF)

Les inhibiteurs de fusion interviennent au début du cycle de réplication du VIH en bloquant les protéines de surface du VIH ou perturbant les co-récepteurs des cellules ciblées par le VIH. (Exemple: le T-20 ou Enfuvirtide (Nagalo, B.M. (2010)).

Bien que ces médicaments puissent avoir des effets secondaires passagers ou permanents qui peuvent conduire à l'arrêt ou surtout la modification du traitement, ils ont une efficacité relativement importante lorsqu'ils sont correctement suivis.

Le traitement antirétroviral repose actuellement sur une trithérapie associant généralement 2 inhibiteurs nucléosidiques et 1 inhibiteur non nucléosidique ou un inhibiteur de protéase (Nagalo, B.M. (2010)).

I.2 Diagnostic biologique des infections virales :

I.2.1 Les bases de diagnostic sérologiques :

Le diagnostic sérologique des infections virales utilise des tests immuno-enzymatiques, ce sont des techniques appliquées à la recherche d'antigène ou d'anticorps dans le plasma ou le sérum humain. L'antigène ou l'anticorps recherché va entrer en réaction avec, respectivement, l'anticorps ou l'antigène fixe sur la phase solide (Leland, D. S. et Ginocchio, C. C. (2007)).

La détection du complexe Ag-Ac s'effectue par l'addition d'un conjugué (Ac ou Ag sur lequel est fixé une enzyme). Cette enzyme conjuguée est révélée par un substrat qui passe d'une phase non colorée à une phase colorée comme suite à une catalyse par cette enzyme.

La densité optique (Do) de la solution est mesurée par un spectrophotomètre. Les résultats sont habituellement exprimés par un ratio qui correspond au rapport du signal de l'échantillon sur le signal du seuil établi pour chaque trousse utilisée d'où, le ratio est proportionnel à la quantité de marqueur présente dans le sérum. Il est inversement proportionnel pour les techniques par compétition (Leland, D. S. et Ginocchio, C. C. (2007)).

- Le test sérologique détectera :

La présence d'anticorps ou séropositivité : ceci signe le contact avec le virus mais ne permet pas de dater le moment de l'infection. Pour certains virus qui persistent dans l'organisme cela indique également l'état de porteur (Leland, D. S. et Ginocchio, C. C. (2007)).

L'apparition d'anticorps entre deux sérums successifs prélevés généralement à un intervalle de 10 à 21 jours. On parle de séroconversion. Ceci indique qu'un premier contact a eu lieu autour du moment du premier prélèvement (Leland, D. S. et Ginocchio, C. C. (2007)).

Une augmentation de la concentration d'anticorps entre deux sérums. Cette concentration s'exprime en titre ou en unités test utilisées. Une augmentation indique qu'il y a eu une stimulation du système immunitaire : celle-ci peut être due à une infection récente ou à une réactivation virale symptomatique ou non (Leland, D. S. et Ginocchio, C. C. (2007)).

La présence d'anticorps de la classe M (IgM), qui sont présents pendant les premiers mois après un contact.

La présence d'anticorps IgG de faible avidité. L'avidité des anticorps augmente au cours des mois succédant à une infection aiguë. Une faible avidité indique donc une infection récente (Leland, D. S. et Ginocchio, C. C. (2007)).

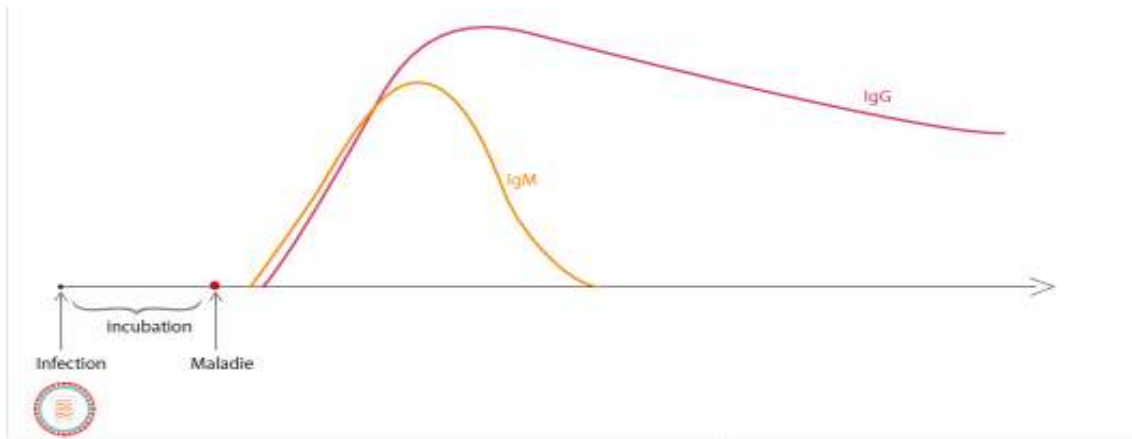


Figure 9 : Apparition d'anticorps après infection et leur détection

I.2.2 Tests de dépistage :

Le dépistage des anticorps contre les infections virales s'effectue le plus souvent par des tests dits ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) ou par des tests simples /rapides utilisant comme antigène des lysats viraux ou des protéines recombinantes ou synthétiques. Ces protéines correspondent aux épitopes immuno-dominants des virus (Hocine, M. (2011)).

I.2.2.1 Tests ELISA :

Ce sont des tests immuno-enzymatiques. Actuellement trois méthodes de tests ELISA sont utilisées pour le dépistage :

- Tests ELISA « Sandwich » :

- Le marqueur recherché (Ag ou Ac) se trouve pris entre deux couches opposées du marqueur, spécifique et de même nature ;
- Le premier marqueur est fixé sur la phase solide tandis que le 2^{ème} est apporté sous forme de conjugué (marqueur + enzyme) ;
- L'élément recherché pris en sandwich est apporté par le sérum ou le plasma à l'étudier ;
- La révélation se fait grâce à l'adjonction d'un substrat spécifique de l'enzyme avec l'apparition d'une réaction colorée ;
- L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'Ac ou d'Ag présents dans le sérum ou le plasma (Hocine M, (2011)).

- Tests ELISA « indirect » :

- Le principe repose sur l'utilisation d'une phase solide sensibilisée par des antigènes purifiés, pour une recherche d'Ac spécifique ;

- La révélation du complexe Ag-Ac se fait par addition d'un conjugué constitué par des immoglobulines anti IgG humaine, couplés à une enzyme (peroxydase, phosphates alcaline.....) ;
- La révélation de l'activité enzymatique se fait par addition d'un substrat dont la modification se traduit par l'apparition d'une coloration dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'Ac présents dans le sérum étudié ;
- L'intensité de la coloration est déterminée par la mesure de la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre approprié (lecteur de micro plaques ELISA) (Hocine M, (2011)).

- Tests ELISA « compétition » :

- Cette technique est basée sur une compétition vis-à-vis d'un Ag fixé sur une phase solide, entre les anticorps recherchés dans l'échantillon et un conjugué fourni par la trousse de diagnostic ce conjugué est constitué d'Ac de même spécificité que les Ac recherches dans l'échantillon ;
- Le conjugué et l'échantillon sont introduits simultanément dans le milieu réactionnel, de façon à entrer en compétition pour la fixation sur l'Ag de la phase solide. Cette fixation est influencée par la différence d'affinité de Ac du conjugué et de l'échantillon, vis-à-vis de l'antigène ;
- La nature du complexe Ag-Ac formé, révélée par l'addition du substrat de l'enzyme se traduit par une coloration d'intensité inversement proportionnelle à l'aide d'un lecteur de microplaques ELISA. Plus faibles sera la densité optique, plus élevée sera la quantité d'Ac présents dans le sérum ;
- L'interprétation des résultats est basée sur le calcul d'un seuil d'inhibition indiqué par le fabricant (Hocine M, (2011)).

I.2.2.2 Tests simples/rapides :

Ce sont le plus souvent des tests dits par immunochromatographie, avec une filtration ou une migration du sérum sur une membrane ou un support recouvert d'antigènes recombinants. Lors de cette filtration ou migration, les anticorps s'ils sont présents dans l'échantillon, se fixeront sur les antigènes présents sur le support. La révélation de cette liaison antigène-anticorps se fait généralement par un conjugué. Le test se réalise en une dizaine de minutes en général de façon unitaire. Cette simplicité d'emploi leur assure une large diffusion dans les pays en voie de développement. Pour l'ensemble de ces tests, l'absence de résultats quantifiés et enregistrés sur un support papier est un obstacle à la traçabilité des manipulations (Plantier, J.C. et Simon, F.(2002)).

Ce sont des tests de dépistages unitaires qui permettent la détection des anticorps et des antigènes des infections virales. Le principe des tests de détection rapides est fondé sur des

techniques ELISA. Ces tests sont capables de dépister à partir d'un sérum ou d'un plasma humain, les anticorps et les antigènes des infections virales (Plantier, J.C. et Simon, F.(2002)) :

- Antigène ou anticorps viral fixé sur un support ;
- Capture des anticorps et des antigènes présents dans le sang (plasma, sérum, sang total, ou dans la salive) ;
- Basé sur un principe d'immuno-filtration ou immuno-chromatographie ;
- Révélation du complexe antigène-anticorps par un système à réaction colorée (positive).

Ils existent différents types de supports godet, carton, bandelette. Pour résumer les tests rapides sont pratiqués à partir de micro-prélèvements de sang veineux (piqûre au bout du doigt, au talon des nouveaux nés). Ils sont techniquement très faciles à réaliser et le résultat rapide est obtenu au bout de 10 à 40 minutes (Plantier, J.C. et Simon, F.(2002)).

Ce sont des tests qui ne sont pas adaptés aux très grandes séries, non automatisés à résultats qualitatifs : positif ou négatif (algorithme actuel nécessite un test de confirmation) (Plantier, J.C. et Simon, F.(2002)).

I.2.3 Tests de confirmation :

Il s'agit essentiellement du Western Blot (WB) et des immunoblots utilisant des protéines de synthèse. La technique du Western Blot (WB) est une méthode de référence. Mais son interprétation peut être délicate. Le WB, consiste à un transfert sur nitrocellulose, après migration électrophorétique en gel de polyacrylamide, de protéines d'un lysat viral (Nagalo, B.M. (2010)).

Sur la bandelette de WB, différentes protéines constitutives seront reconnues par des anticorps spécifiques anti-VIH-1 ou VIH-2. Le recours au WB pour une confirmation de sérologie VIH positive n'est pas systématique dans tous les pays, y compris dans les pays industrialisés. Il porte, en toute rigueur sur un second prélèvement sérique, pour se mettre à l'abri d'une éventuelle erreur d'étiquetage du premier prélèvement. Il permet parfois d'évoquer une séroconversion récente ou une infection par des variants lors de profils incomplets. En cas d'infection à VIH, le WB sera le plus souvent pleinement réactif et donnera peu d'information complémentaire. Inversement, en cas de "non infection", des réactivités non spécifiques sont fréquentes et d'interprétation difficile. Aussi, des alternatives au WB sont nécessaires pour éviter un recours systématique à cet examen coûteux et pas toujours très informatif (Nagalo, B.M. (2010)).

Les immunoblots utilisant des protéines de synthèse sont des tests de commercialisation, récente et d'un coût élevé par rapport au WB. C'est une disposition de différentes protéines recombinantes ou peptides de synthèse présentée sur bandelette ou sur support plastique. Ces tests ne sont qu'une présentation sur un format différent des antigènes utilisés lors des examens de dépistage et ils n'apportent ainsi aucune information complémentaire (Nagalo, B.M. (2010)).

I.2.4 Les algorithmes de dépistage des infections virales :

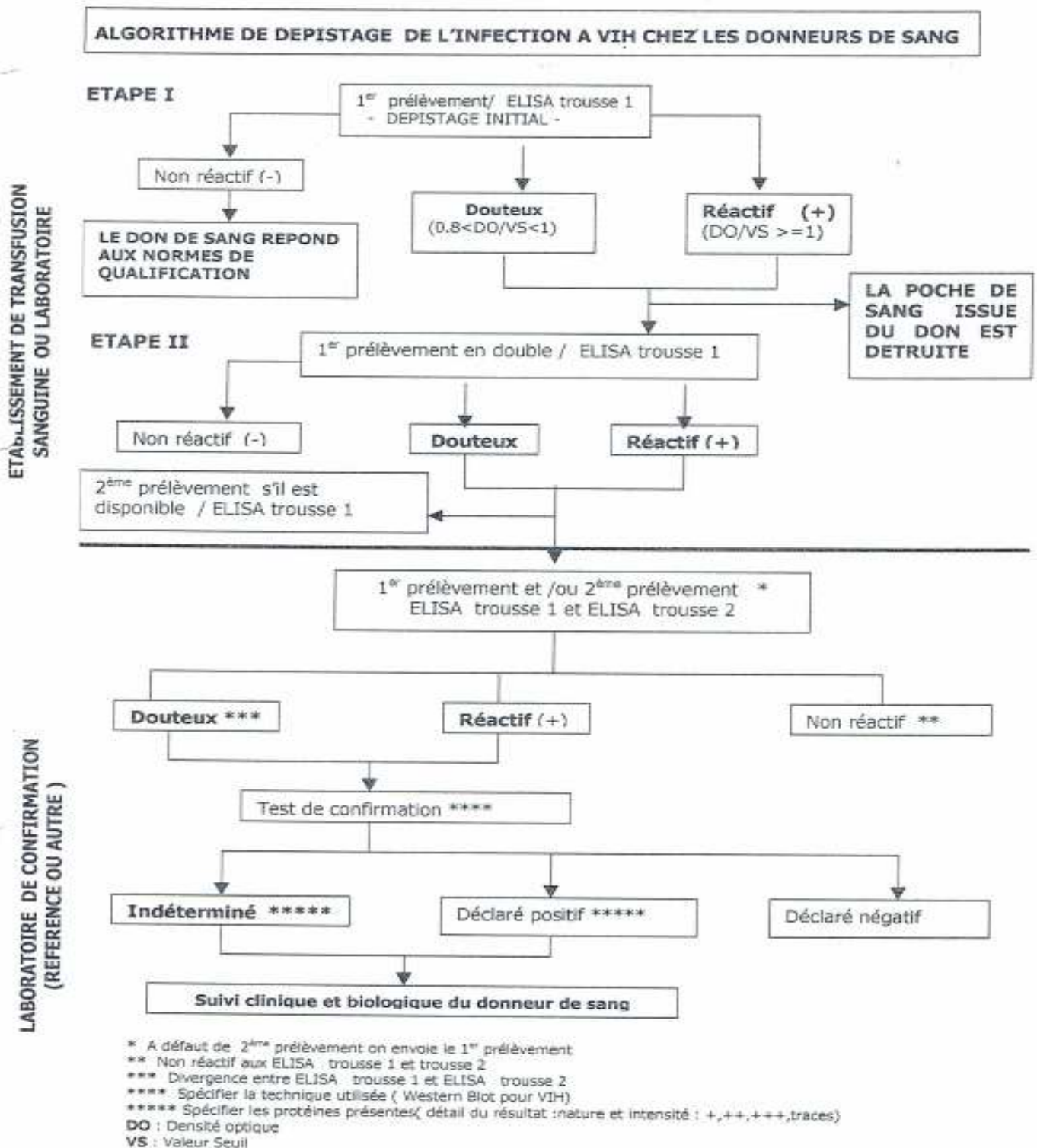


Figure 10 : Algorithme de dépistage du VIH

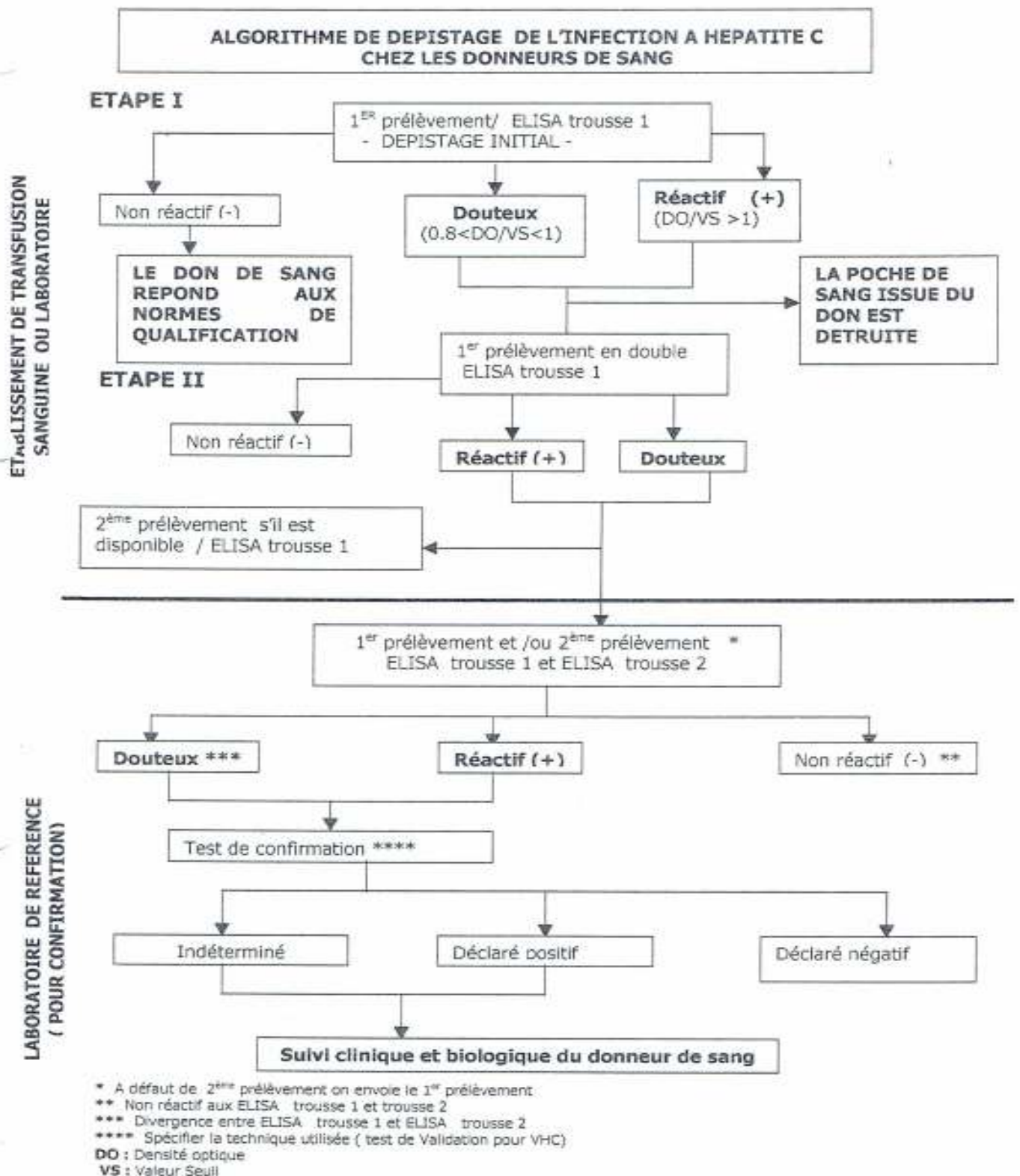


Figure 11 : Algorithme de dépistage de l'hépatite C

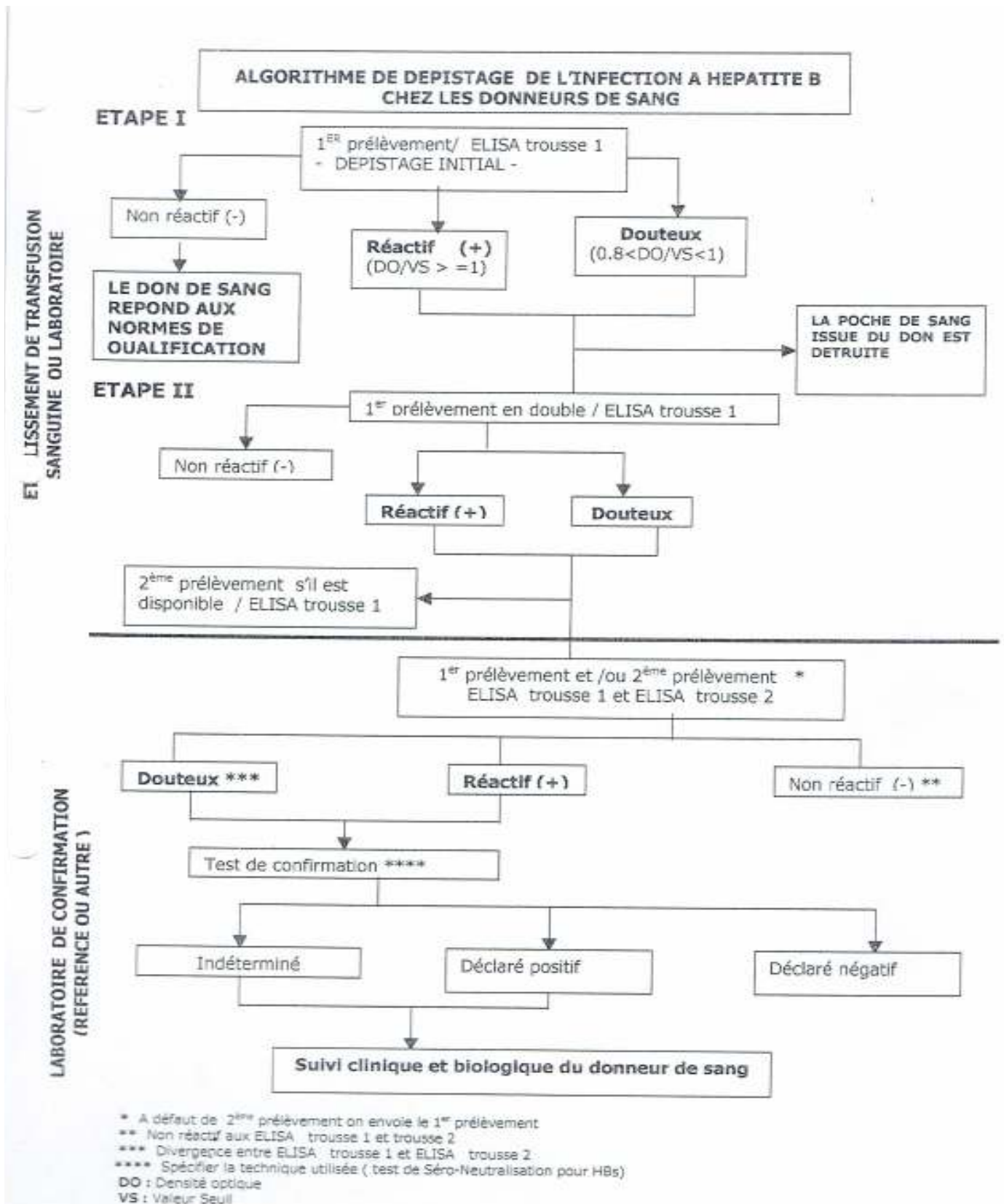


Figure 12 : Algorithme de dépistage de l'hépatite B

II- Matériels et méthodes

II.1 Cadre de l'étude et déroulement des travaux :

L'étude s'est déroulée à l'hôpital Ahmida Benadjila de la wilaya de Laghouat au laboratoire de wilaya de Transfusion Sanguine (CWTS) comprenant 04 sections la sérologie infectieuse où les échantillons ont été collectés, l'immuno-hématologie, la préparation et l'assurance qualité.

Le CWTS est une structure opérationnelle chargée d'assurer la disponibilité en sang. Il assure la disponibilité et l'approvisionnement des produits sanguins surtout l'étendue du territoire de la wilaya de Laghouat, tout en respectant les normes internationales de sécurité transfusionnelle.

II.2 Collecte des échantillons :

Nos travaux de thèses se sont déroulés sur une période allant du 1 juin au 28 juin 2017.

Au total 100 donneurs de sang ont été retenus pour l'étude. Il s'agit d'une population de donneurs réguliers et de donneurs irréguliers, âgés d'au moins 18 ans, de toutes professions et catégories sociales confondues.

Les produits biologiques que nous avons examinés sont le sérum ou le plasma (EDTA, héparine et citrate). Ces produits ont testés au laboratoire avec les différents kits de dépistage

II.3 Préparation des échantillons et mises en garde :

Le sang est prélevé de manière aseptique par ponction veineuse et le plasma ou le sérum est préparé en utilisant des techniques standard de préparation des échantillons pour analyse en laboratoire clinique. Aucune influence n'a été observée dans la préparation de l'échantillon avec le citrate, l'EDTA et de l'héparine. Les échantillons doivent être clairement identifiés par des codes ou des noms afin d'éviter une mauvaise interprétation des résultats.

Hémolysé (rouge) et visiblement hyperlipémique (laiteux) les échantillons doivent être jetés car ils pourraient générer des résultats erronés. Les échantillons contenant des résidus de fibrine ou particules lourdes ou de filaments microbiens et les organismes doivent être jetés car ils pourraient donner lieu à de faux résultats.

Sérum et le Plasma peuvent être stockés à +2...+8°C pendant jusqu'à cinq jours après la collecte. Pour les périodes de stockage plus longues, les échantillons peuvent être conservés congelés à -20°C pendant plusieurs mois. Tous les échantillons congelés ne doivent pas être congelés/décongelés plus d'une fois car cela peut générer des particules qui pourraient affecter le résultat du test.

II.4 Préparation des réactifs et mise en garde :

Laisser les réactifs à atteindre la température ambiante (18.24°C) au moins 30 minutes avant utilisation. Prendre que le volume nécessaire pour l'essai, Retourner la portion inutilisée à +2...+8°C.

Laisser la microplaque pour atteindre la température ambiante (environ 1 heure) avant d'ouvrir le contenant.

Les barrettes non utilisées doivent être replacées dans la poche en aluminium fermement zippée et stockée à $2 \dots 8^{\circ}\text{C}$.

Lors de l'ouverture de la première fois, des bandes résiduelles sont stables jusqu'à deux mois ou jusqu'à ce que l'indicateur d'humidité à l'intérieur du sachet déshydratant passe du jaune au vert.

Les réactifs prêts à l'emploi doivent être mélangés avec le vortex.

La solution de lavage concentrée 25x doit être diluée avec de l'eau déminéralisée et mélangée doucement.

Exemple: Ajouter 50 ml de solution de lavage 25x à 1200 ml d'eau déminéralisée. Comme certains des cristaux de sel peuvent être présents dans le flacon, prendre soin de dissoudre tout contenu lors de la préparation de la solution. Dans la préparation d'éviter la formation de mousse que la présence de bulles peut donner origine à une mauvaise efficacité du lavage après dilution, la solution de lavage est stable pendant 6 jours à $+2.8^{\circ}\text{C}$.

II.5 Matériel utilisés :

- Micropipettes calibrées 200 μl , 50 μl et 10 μl et embouts jetables en plastique ;
- Eau bi distillée ou déminéralisée ;
- Minuterie réglable jusqu'à 60 minutes au moins ;
- Papier absorbant ;
- Incubateur thermostatique calibré pour microplaques ELISA (sec ou humide) réglé sur $+37^{\circ}\text{C}$ (tolérance 5°C) ;
- Lecteur de microplaques ELISA avec filtre à 450 nm (lecture blancs) ;
- Station de lavage calibrée pour microplaques ELISA ;
- Vortex ou instrument de mélange similaire.

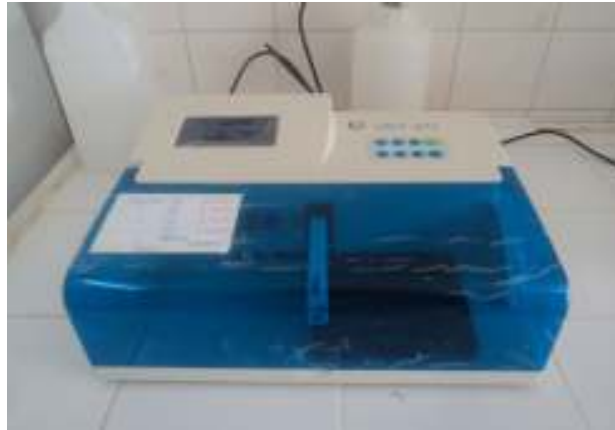


Figure 13 :Laveur calibrée pour microplaques ELISA



Figure 14 :Lecteur de microplaques ELISA(spectrophotomètre de plaque)

II.6 Méthodes de diagnostic :

Les analyses sérologiques effectuées sont la recherche des anticorps et / ou des antigènes dirigés contre le VIH, VHB et le VHC.

La sérologie a été effectuée en utilisant des tests de diagnostic rapide TDR et ELISA couplé à un spectrophotomètre lecteur de microplaques.

II.6.1 Les tests de diagnostic rapide (TDR) :

Ces tests se basent sur le principe de l'immuno-chromatographie sur membrane. Le sérum, plasma ou sang totale déposé sur le support va migrer par capillarité en entraînant avec lui des réactifs déjà présents sur le TDR, rencontrer les antigènes ou les anticorps préalablement déposés sur la membrane. Lorsque les anticorps ou les antigènes recherchés sont présents, ils réagissent avec les antigènes ou les anticorps fixés sur la membrane pour donner une coloration visible à l'œil nu.

- Mode opératoire :

La technique consiste à déposer **100 µl** de liquide biologique (sérum, Plasma ou sang totale) dans la zone de dépôt de la bandelette test puis à lire les résultats au plus tard 15 minutes après le début de la migration. La présence des anticorps ou des antigènes se traduit par l'apparition de deux traits distincts rouges : un trait dans la zone de contrôle **C** et un autre trait dans la zone de test **T**.

L'intensité de la coloration dans la zone de test varie en fonction de la concentration d'anticorps ou d'antigènes dans l'échantillon testé. Par conséquent un test avec une faible coloration est considéré positif. L'absence d'anticorps ou d'antigènes est signifiée par l'apparition d'un seul trait rouge dans la zone de contrôle **C** et aucun trait dans la zone de test **T**. Les résultats sont invalides si le trait du contrôle n'apparaît pas. Cela peut être dû à l'insuffisance de la quantité de sérum déposé ou au non respect des procédures d'utilisation du test.

Nous avons la recherche d'anticorps anti-VIH et anti-VHC, et la recherche d'antigène s pour l'hépatite B Ag Hbs

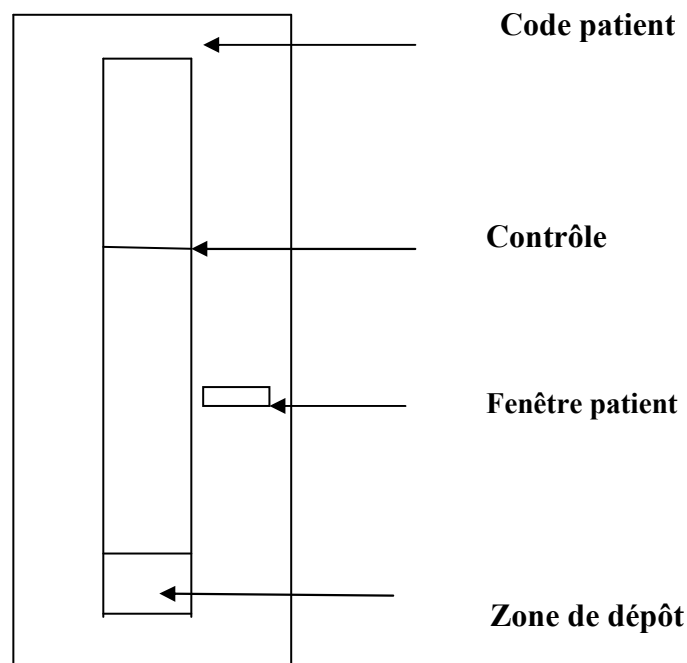


Figure 15 : Tests de diagnostic rapide

- Limite du test :

Le TDR est destiné à détecter les anticorps ou les antigènes dans le sérum, le plasma et le sang total humains. D'autres liquides biologiques risquent de fournir des résultats imprécis. L'intensité de la barre patient n'est pas nécessairement corrélée avec le titre de l'anticorps se trouvant dans l'échantillon.

Un résultat faussement négatif peut être obtenu dans les circonstances suivantes :

- Faibles taux d'anticorps (début de séroconversion) en dessous de la limite de détection du test ;
- Infection par un variant du virus moins facilement détectable par la configuration des tests ;
- Patient présentant des anticorps ou des antigènes qui ne réagissent pas avec les antigènes ou les anticorps spécifiques utilisés dans la configuration du test ;
- Condition de traitement de l'échantillon provoquant une perte de polyvalence de l'anticorps ou de l'antigène.

Des résultats positifs devront être ré analysé en utilisant une autre méthode et les résultats devront être évalués à la lumière clinique globale avant d'établir un diagnostic.

Des échantillons de sang total ou de plasma contenant des anticoagulants autre que l'EDTA peuvent donner des résultats incorrects.

II.6.2diagnostic par tests ELISA :

C'est un test immuno- enzymatique (ELISA) basé sur le principe du « sandwich ». Les cupules microelisa sont recouvertes de plusieurs antigènes ou anticorps, Un mélange d'antigènes et d'anticorps combiné à de la peroxydase de Raifort (**HRP**) sert de conjugué, le tétraméthyl benzidine (**TBM**) et le peroxyde sont utilisés comme substrat. La coloration qui apparaît à la fin du test indique la présence d'anticorps ou d'antigènes du virus recherché. L'absence de coloration ou une coloration très claire indique l'absence d'anticorps ou d'antigènes du virus.

L'échantillon à tester ou le contrôle approprié contenant des anticorps, ou des antigènes est incubé dans les cupules. Si des anticorps sont présent dans l'échantillon, un complexe antigène / anticorps en phase solide se forme. Si l'antigène est présent dans l'échantillon, un complexe anticorps/ antigène en phase solide se forme. Après lavage et incubation avec le substrat TMB, une coloration se développe qui vire au jaune au moment de l'arrêt de laréaction par l'acide sulfurique.

Si un anticorps et/ou un antigène est présent dans l'échantillon il se développe une coloration intense.

Au contraire, si l'échantillon ne contient aucun anticorps et aucun antigène VIH, le test présente une absence de coloration ou une coloration très claire après addition du substrat.

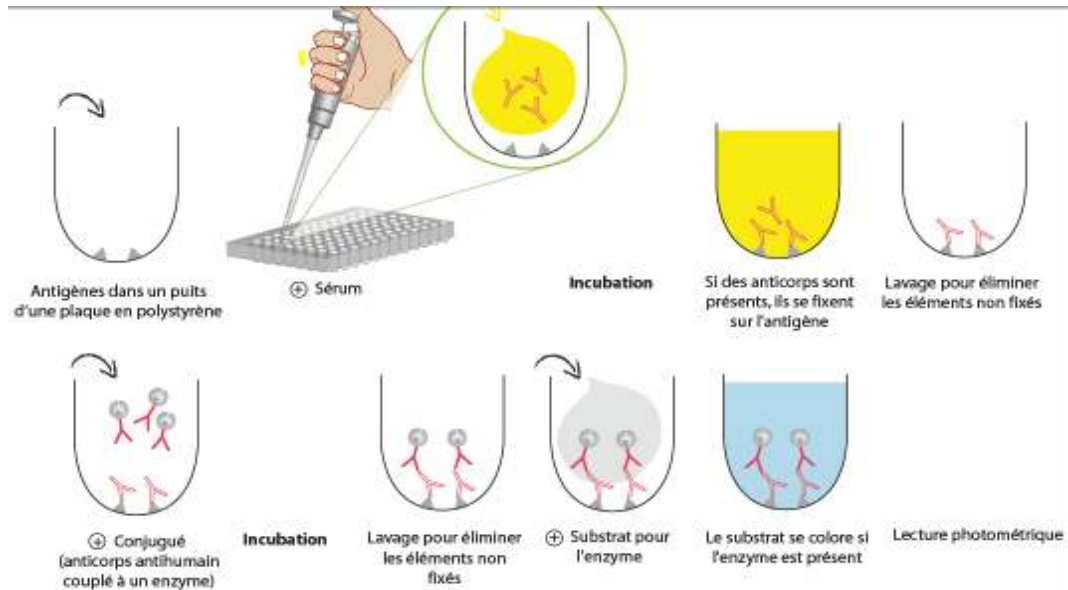


Figure 16 : Principe du test ELISA sandwich

- Limite du test :

Tous les tests immuno-enzymatiques très sensibles peuvent donner des réactions non spécifiques. C'est pourquoi, la spécificité des échantillons positifs reproductibles doit être confirmée avec une méthode appropriée.

- Mode opératoire :

- Hépatite B :

- Distribuer 20 μL de Diluant pour échantillon dans chaque puits sauf le puits pour l'exploitation de suppression ;
- Ajouter 100 μL de l'Echantillon, 100 μL des Contrôles Négatifs et Positifs en double pipetage de haut on bas, pour l'homogénéisation ;
- Pipette doucement en évitant débordement et de contaminer les puits adjacents ;
- Sceller bandes en toute sécurité avec microplaque scellant ;
- Incuber la microplaque pendant 60 min à 37°C ;
- Après incubation, éliminer la solution des puits en inversant la microplaque et en tapant sec sur une serviette de papier ;
- Ajouter 100 μL de Conjugué dans chaque puits, sauf le 1er découpage bien, et couvrir avec le scellant ;
- Incuber ta microplaque pendant 30 min à 37°C ;
- Après incubation, éliminer ta solution des puits en inversant ta microplaque et en tapant sec sur une serviette de papier. Laver la plaque de microtitration à 3 cycles selon le mode opératoire de lavage ;
- Pipette 50 μL de la Substrat A et 50 μL de la Substrat B dans chaque puits, le puits blanc inclus ;

- Incuber la microplaque pendant 30 min à +18.,25°C. Remarque importante: Ne pas exposer à une forte illumination directe. Haut de fond peut être générée ;
- Pipeter 50 µL de solution d'arrêt dans tous tes puits à l'aide de la même séquence de pipetage comme à l'étape 12 pour arrêter la réaction enzymatique.

- Hépatite C

- Distribuer 100 µL de Diluant pour échantillon dans chaque puits sauf le puits pour l'exploitation de suppression ;
- Ajouter 10 µL de l'Echantillon, 10 µL de Contrôles Négatifs et Positifs en double pipetage de haut on ha, pour l'homogénéisation ;
- Pipette doucement en évitant débordement et de contaminer les puits adjacents ;
- Sceller bandes en toute sécurité avec microplaque scellant ;
- Incuber la microplaque pendant 60 min à 37°C ;
- Après incubation, éliminer la solution des puits en inversant la microplaque et en tapant sec sur une serviette de papier. Laver la plaque de microtitration cinq cycles selon le mode opératoire de lavage ;
- Ajouter 100 µL de Conjugué dans chaque puits, sauf le 1er découpage bien, et couvrir avec le scellant ;
- Incuber ta microplaque pendant 30 min à 37°C ;
- Après incubation, éliminer ta solution des puits en inversant ta microplaque et en tapant sec sur une serviette de papier. Laver la plaque de microtitration à 3 cycles selon le mode opératoire de lavage ;
- Pipette 50 µL de la Substrat A et 50 µL de la Substrat B dans chaque puits, le puits blanc inclus ;
- Incuber la microplaque pendant 30 min à +18.,25°C. Remarque importante: Ne pas exposer à une forte illumination directe. Haut de fond peut être générée ;
- Pipeter 50 µL de solution d'arrêt dans tous tes puits à l'aide de la même séquence de pipetage comme à l'étape 12 pour arrêter la réaction enzymatique.

- SIDA HIV :

- Distribuer 100 µL de Diluant pour échantillon dans chaque puits sauf le puits pour l'exploitation de suppression ;
- Ajouter 100 µL de l'Echantillon, 100 µL de Contrôles Négatifs et Positifs en double pipetage de haut on ha, pour l'homogénéisation ;
- Pipette doucement en évitant débordement et de contaminer les puits adjacents ;
- Sceller bandes en toute sécurité avec microplaque scellant ;
- Incuber la microplaque pendant 60 min à 37°C ;
- Après incubation, éliminer la solution des puits en inversant la microplaque et en tapant sec sur une serviette de papier. Laver la plaque de microtitration cinq cycles selon le mode opératoire de lavage ;

- Ajouter 200 µL de Conjugué # 1 dans chaque puits, sauf le 1er découpage bien, et couvrir avec le scellant ;
- Incuber ta microplaque pendant 30 min à 37°C ;
- Après incubation, éliminer ta solution des puits en inversant ta microplaque et en tapant sec sur une serviette de papier. Laver la plaque de microtitration à 3 cycles selon le mode opératoire de lavage ;
- Distribuer 200 IIL de Conjugué # 2 dilué dans chaque puits; sauf le 1er découpage bien, et couvrir avec le scellant ;
- Incuber la microplaque pendant 30 min à 37°C ;
- Après incubation, éliminer la solution des puits en inversant, la microplaque et en tapant sec sur une serviette de papier. Laver la plaque de microtitration cinq cycles selon le mode opératoire de lavage ;
- Pipette 150 µL de la Substrat TMB dans chaque puits, le puits blanc inclus ;
- Incuber la microplaque pendant 30 min à +18.,25°C. Remarque importante: Ne pas exposer à une forte illumination directe ;
- Pipeter 100 µL de solution d'arrêt dans tous tes puits à l'aide de la même séquence de pipetage comme à l'étape 12 pour arrêter la réaction enzymatique.

- Calcul de la valeur seuil :

• Pour le HIV

$$(CN - \text{blanc}) + 0.17$$

$$CN = \text{moyenne des contrôles négatifs}$$

• Pour le HCV

$$CN \times 2.1$$

• Pour le HBV

$$CN \times 2.8$$

II.7 Performances des tests rapides :

Le statut des infections virales définitif des échantillons analysés au CWTS est établi par un algorithme d'analyse puissant.

C'est un processus de reprise des échantillons par un test différent de celui utilisé en première analyse. Ensuite sanctionné par un contrôle de qualité avec un test de confirmation qui le test ELISA.

La comparaison des résultats issus des tests rapides par rapport au test ELISA s'effectue par la mesure de la sensibilité et la spécificité.

- **Sensibilité** : Capacité d'un test à pouvoir détecter les sujets malades dans une population donnée ; mesure ainsi l'aptitude d'un test à éliminer les faux négatifs.

Vp : VraiPositif
Fp:FauxPositif
Vn:VraiNégatif
Fn : Faux Négatif

$$Se = \frac{Vp}{Vp + Fn} * 100$$

- **Spécificité** : Capacité d'un test à détecter des sujets sains dans une population donnée ; mesure ainsi l'aptitude d'un test à éliminer les faux positifs.

$$Sp = \frac{Vn}{Vn + Fp} * 100$$

III- Résultats et discussion

III.1 Résultats :

III.1.1 Paramètres des donneurs :

Les donneurs inclus (100) dans l'étude ont un âge compris entre 18 et 49 ans et la tranche d'âge la plus présente est celle de 18 à 33 ans avec un pourcentage de 68% (68 / 100). Les donneurs de sexe masculin sont les plus représentés. Il y'a en effet 74% (74/100) de donneurs de sexe masculin contre 26 % (26/100) de donneurs de sexe féminin.

Les donneurs ont été repartis en catégories suivant le lieu du don :

- **ARMEE** (tous les corps habillés).
- **SCOLAIRES** (élèves et étudiants des universités et des grandes écoles).
- **SALARIES** (fonctionnaires et travailleurs d'entreprises).
- **HORS** (collecte hors de Laghouat).
- **CWTS** (collecte fixe au centre de wilaya de transfusion sanguine).

Un donneur est qualifié de donneur régulier après en moyenne 3 dons / an et s'il a moins de 3 dons /an il est un donneur non régulier. Les sujets étudiés (donneurs de sang) comprennent 84 % (84/100) de donneurs non réguliers et 16 % (16/100) de réguliers.

Tableau 01 :Lieu du don, Sexe, Types de donneurs

LIEU DU DONN	ARMEES	CWTS	HORS	SALARIÉS	SCOLAIRES	TOTAL N(%)
SEXE						
FEMMES	0	21	5	7	19	26(26)
HOMMES	33	58	16	10	31	74(74)
TYPES DE DONNEURS	ARMEES	CWTS	HORS	SALARIÉS	SCOLAIRES	TOTAL N(%)
NON REGULIERS	36	57	27	19	29	84(84)
REGULIERS	10	16	0	4	2	16(16)

III.1.2 Systèmes d’analyses et les infections virales :

Le tableau ci-dessous indique que les échantillons collectés dans notre étude sont analysés par les tests rapides et le test ELISA. Ces deux systèmes d’analyses donnent des résultats équivalents pour la détection des infections virales chez les donneurs.

Tableau 02 : Systèmes d’analyses et infections virales

Numéro du donneur	Test rapide			Test ELISA		
	Anti-HIV	Anti-HCV	Ag HBS	Anti-HIV	Anti-HCV	Ag HBS
01.....17	négatif	Négatif	négatif	négatif	négatif	négatif
18	négatif	POSITIF	négatif	négatif	négatif	négatif
19.....22	négatif	Négatif	négatif	négatif	négatif	négatif
23	négatif	POSITIF	négatif	négatif	négatif	négatif
24.....43	négatif	Négatif	négatif	négatif	négatif	négatif
44	négatif	POSITIF	négatif	négatif	négatif	négatif
45.....74	négatif	Négatif	négatif	négatif	négatif	négatif
75	négatif	Négatif	POSITIF	négatif	négatif	POSITIF
	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif

76.....91						
92	négatif	POSITIF	négatif	négatif	négatif	négatif
93.....100	négatif	Négatif	négatif	négatif	négatif	Négatif



Test rapide positif (présence 2 traits)



Test rapide négatif

Microplaque ELISA avant l'ajout de solution stop

- Couleur bleu (échantillon positif)
- Couleur transparente (échantillon négatif)



Microplaque ELISA après l'ajout de solution stop

- Couleur jaune (échantillon positif)
- Couleur transparente (échantillon négatif)



Figure 17 : Echantillons réels des tests de diagnostic rapide et test ELISA

Les résultats positifs et négatifs sont obtenus après la mesure des densités optiques à une longueur d'onde de 360 nm de tous les échantillons plus les contrôles négatifs afin de calculer la moyenne des densités optiques des contrôles négatifs (minimum 03 contrôles) pour calculer la valeur seuil de chaque paramètre. On compare à chaque fois la densité optique des échantillons avec la valeur seuil.

$DO \geq VS$ échantillon positif

$DO < VS$ échantillon négatif

III.1.3 Performances des tests rapides :

Les résultats en terme de performances des tests rapides, obtenus pour cette taille (100 donneurs) sont :

- **Sensibilité :** $Se = 100\%$

- **Spécificité:** $Sp = 95\%$

III.2. Discussion

Cette étude est une évaluation des tests de dépistage des infections virales sur des donneurs de sang bénévoles, ces donneurs étaient apparemment en bonne santé et respectaient les conditions requises pour un don de sang (âge, poids, antécédents médicaux,...). Il a été procédé sur tous les échantillons de sang, une recherche des marqueurs dirigés contre le VIH, le VHC, le VHB conformément aux normes internationales de sécurité transfusionnelle.

Nous nous sommes intéressés à cette catégorie de donneurs pour deux principales raisons :

- Garantir une sécurité transfusionnelle maximale dans la population;
- Lutter contre les infections virales par la mise en place d'une stratégie efficace de diagnostic précoce de l'infection chez les donneurs de sang au CWTS en vue de leur prise en charge médicale rapide.

- Répartition suivant l'âge et le sexe des donneurs :

La répartition suivant l'âge des donneurs de sang révèle que l'âge des donneurs est compris entre 18 - 49 ans et la tranche d'âge 18 - 30 ans est majoritaire avec 12,6 % des dons. L'explication réside dans le fait que la politique de collecte mobile est plus présente dans les universités et les établissements scolaires que dans les autres groupes d'individus susceptibles de donner du sang. Cette tranche d'âge de donneurs est essentiellement jeune, plus disposée et volontaire à donner du sang.

Les donneurs de sexe masculin sont les plus représentés. La collecte comporte en effet 84 % de donneurs de sexe masculin contre 16 % de donneurs de sexe féminin. La différence de sexe observée dans les dons s'explique en grande partie par les contre-indications du don de sang chez les femmes : femmes enceintes, allaitantes ou en menstruation. A cela s'ajoute la peur que manifestent de nombreuses femmes devant le don de sang.

Nous avons constaté que la majorité des dons sont effectués par des donneurs occasionnels (non réguliers). Pour la plupart des donneurs non réguliers, il s'agit plus d'un dépistage que d'un don bénévole de sang.

Le pourcentage observé chez les ARMES montre effectivement qu'ils sont les plus importants donneurs de sang. Cependant la majorité des donneurs réguliers viennent du CWTS. Il faudrait travailler à fidéliser plus les autres catégories afin d'assurer un grand nombre de dons plus sécurisés. Cette fidélité passera par une sensibilisation sur l'importance de ce statut de donneurs par le biais de canaux d'informations (radios, télévisions etc.) et d'association de jeunes, lieux d'enseignements. Cette fidélité passera par une sensibilisation sur l'importance de ce statut de donneurs par le biais de canaux d'informations (radios, télévisions etc.) et d'association de jeunes, lieux d'enseignements. Un système pourrait consister aussi par des

entretiens qui serviront à convertir des donneurs dits familiaux en donneurs bénévoles réguliers puisque ceux –ci ont déjà fait ou s’apprêtent à faire un don de sang.

- Comparaison des tests de dépistage :

Nous avons comparé les deux méthodes utilisées en routine au CWTS pour le diagnostic sérologique des infections virales (HIV, HCV et HBV), tests rapides et ELISA.

Aucune discordance statistiquement significative n’a été mise en évidence entre les efficacités des deux techniques de diagnostics sérologiques. En effet l’ELISA a fourni autant des résultats négatifs que les tests rapides.

Sur les 100 donneurs retenus pour l’étude 05 étaient positifs par les tests rapides (04 cas pour l’hépatite C et 01 un cas pour l’hépatite B). Alors que les résultats de l’ELISA donnent seulement un cas positif pour l’hépatite B, qui est le même cas trouvé avec les tests rapides. Aucun cas positif n’est trouvé de SIDA pour les deux tests utilisés.

Ces résultats confirment que la recherche des marqueurs sérologiques chez les donneurs de sang par les tests rapides peut donner des faux positifs, c’est le cas de l’hépatite C (marqueurs infectieux anti-HCV), qui sont trouvés négatifs par le test ELISA. Les donneurs vont être déclarés comme négatifs, suivis d’un rejet systématique des poches de sang.

Le donneur porteur de l’antigène de surface s (Ag Hbs) du HBV est trouvé positif par les deux tests de dépistages. On peut dire dans ce cas-là que le test ELISA a confirmé la positivité du cas ; donc on peut le déclarer comme un cas positif ou le médecin du CWTS provoque et oriente le donneur vers un spécialiste qui lui demande un test de confirmation (la recherche du virus) pour entamer le traitement.

C'est-à-dire les échantillons positifs aux marqueurs infectieux ont été soumis à une recherche du virus lui-même par des tests de confirmation après bien sûr le rejet systématique de la poche de sang. Ou le donneur est bénéficié de la gratuité des soins et du suivi biologique.

En transfusion sanguine la sensibilité des tests de diagnostic est une priorité. Le test ELISA est plus intéressant. Il permet le dépistage à grande échelle d’échantillons et il est plus long en durée d’exécution (2 heures minimum), difficile à réaliser d’où, nécessite un personnel qualifié, des laboratoires bien équipés et sophistiqués. Par contre les tests rapides sont utilisés dans les dépistages unitaires. Ils sont indiqués pour un dépistage clinique rapide et ne nécessitent pas de laboratoires équipés.

Les tests ELISA utilisés dans notre étude est de 4^{ème} génération sont nettement plus appropriés que les tests de dépistages rapides pour dépister des primo-infections sur des dons de sang. Pour cette raison, on considère le test ELISA comme test de confirmation pour les tests rapides, qui nous aide à éliminer les faux positifs et également les faux négatifs (les sujets en phase d’infection précoce).

Cette étude montre (pour les 100 donneurs) une faible prévalence des marqueurs du HIV, du VHB et du VHC. Cette prévalence faible reflète une présence de mesures sanitaires adéquates pour lutter contre les infections virales au niveau de notre région.

-Performances des tests rapides :

La sensibilité et la spécificité sont des critères importants dans le choix d'un test.

L'ELISA est un test combiné dit de quatrième génération utilisé dans le diagnostic des infections virales. Ces tests sont capables de détecter aussi bien les anticorps produits contre les infections virales qui marquent la présence précoce de la particule.

Le calcul des performances des tests rapides par rapport au test ELISA comme test de confirmation a montré que les performances des tests rapides confirment leur sensibilité qui est à 100 % et une spécificité légèrement faible. Cela n'élimine pas les différences de la performance des tests rapides sur les sujets en phase d'infection précoce cela nécessite un test de confirmation plus précis.

En effet, 3 mois après une exposition à risque sont nécessaires pour établir un diagnostic des infections virales positives exactes avec un test rapide.

Conclusion et perspectives

La recherche d'une sécurité maximale en transfusion sanguine passe par le diagnostic précoce des principales maladies virales susceptibles d'infecter le receveur. Malgré les énormes progrès médicaux aucun produit biologique ou de synthèse ne peut remplacer les produits sanguins labiles.

Pour cette raison, il faudrait pousser sans cesse les possibilités de diagnostic précoce des infections virales et autres virus transmissibles par le sang. L'utilisation des techniques plus précises peuvent garantir une sécurité maximale et freinée l'expansion de la pandémie de ces infections

Cette étude montre que Les tests ELISA (tests de 4^{ème} génération) sont nettement plus appropriés que les tests de dépistages rapides pour dépister des primo-infections à HIV, HCV et HBV sur des dons de sang. Ces tests rapides sont utilisés principalement dans des cas d'urgence seulement au niveau du CWTS de Laghouat.

L'emploi des tests de dépistages rapides dans les pays en voie de développement surtout dans les régions où l'accessibilité à des techniques modernes est difficile est un recours efficace dans le suivi biologique de l'infection à VIH. Cependant ces tests doivent être constamment améliorés pour parfaire leurs efficacités surtout dans les cas d'infections précoces.

Perspectives

Les travaux de la présente thèse ont, certes fourni des informations épidémiologiques sur les infections virales chez les donneurs de sang a Laghouat, mais pourraient être dans une certaine mesure, approfondis d'avantage. C'est ainsi que nous nous proposons :

- De faire une étude à grande échelle et sur une plus large population qui pourrait aider à mieux comprendre les différents aspects de l'épidémiologie des infections virales chez les donneurs de sang a Laghouat.
- Encore améliorer la sécurité en transfusion sanguine en prolongeant l'étude déjà menée sur d'autres types de maladies présents chez les donneurs de sang : la syphilis par exemple.
- Nous pourrions menées des études approfondies chez les donneurs de sang des primo-infections à un type précis de virus par l'utilisation des technique de recherche du virus lui-même.

References bibliographiques:

- 1- Alter, M.J. (2003), "Epidemiology of hepatitis B in Europe and worldwide", J Hepatol 39 Supp, Vol. 6 No. 1, pp.4-9.
- 2-Bartholomeusz, A. et Schaefer,S.(2004),"Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods", Rev Med Viro, Vol. 14 No. 1, pp. 3-16.
- 3-Benvegna, L., Fattovich, G., Noventa, F., Tremolada,F.etautres (1994),"Concurrent hepatitis B and C virus infection and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis",Cancer, Vol. 74 No. 24, pp. 42-48.
- 4-Bouvet, E. et Rouveix E., (2005), "Transmission sanguine du VIH, (GERES)".
- 5-Chaplain, C. et Belan, A. G. (2006),"Suivi biologique de l'infection VIH: intérêt du génotypage pour la résistance et du dosage des antirétroviraux", Spectra Biologie, No. 151.
- 6-Durand, F., Danic, B., Tardivel, R. et autres (2000),"Découverte d'une infection chronique par le VHC sans séroconversion chez un donneur de sang en France pendant 28 mois", Transfusion clinique et Biologique, Vol. 7 No. 2, pp. 42-50.
- 7-Hocine, M., (2011), "Tests de dépistages", dansProcédures opératoires en sérologie infectieuse,Agence Nationale du Sang, pp. 30-.
- 8-Leland, D.S. etGinocchio, C. C., (2007),"Rol of cell culture for virus detection in the technology",Clinical Microbiology Reviews, Vol. 20 No. 1, pp.49-78.
- 9-Lok, A. S. (2002),Chronic hepatitis B", N Engl J Med, Vol. 346 No. 1, pp. 682-683.
- 10-Nagalo, B.M. (2010), "Diagnostic moléculaire par RT /PCR, du virus VIH-1 et sécurité transfusionnelle", Thèse, Université de Ouagadougou.
- 11-Nubling, C.M., Willkommen, H. et Lower, J.(1995),"Hepatitis C transmission associated with intravenous globulins". Lancet, pp. 11-74.
- 12-Plantier, J.C. et Simon, F. (2002),"Diagnostic sérologique des infections à VIH",Développement et Santé, No. 162.
- 13-Poveda, J.D. (2003), "HEPATITE C diagnostic et suivi biologique",La lettre (pasteur CERBA), N° 58, pp. 2-5.

14-Theze, J.(2008),“lymphocytes as targets and actors in the pathogenesis of HIV infection--therapeutic implications”,Bull AcadNatl Med,Vol. 192 No. 7, pp. 1453-1466.

15-Zeba, T.A. (2012), “Co-infection de virus des hépatites B et C au Burkina Faso:prévalence, marqueurs viraux et caractérisationmoléculaire”, Thèse, Université de Ouagadougou.

Annexe

Prélèvement d'un don de sang

Une fois arrivé à l'établissement de transfusion sanguine, le donneur présente son identité au secrétariat, il passe ensuite à la consultation médicale. Le donneur de sang déclaré apte pour le don de sang, se présente au prélèvement muni d'une fiche d'identification et d'étiquettes adhésives portant le même numéro que la fiche d'identification.

L'infirmier procède au prélèvement en respectant les étapes suivantes:

1. Retirer les poches de l'emballage et vérifier la qualité du contenant et du contenu.
2. Vérifier l'identité du donneur.
3. Apposer les étiquettes autocollantes sur chaque poche et chaque tube pilote au moment du prélèvement.
4. Faire un nœud au niveau de la tubulure (entre aiguille et poche) sans le serrer
5. Placer le garrot au-dessus du pli du coude.
6. Aseptiser la peau au niveau du pli du coude (alcool à 90 O) en s'assurant de l'absence de lésion ou mycose à ce niveau.
7. Clamper la tubulure avec une pince Kocher juste au-dessus de l'aiguille pour éviter l'entrée d'air.
8. Dégainer l'aiguille et piquer franchement la veine au niveau de l'avant-bras/ pli du coude.
9. Enlever le clip et laisser couler le sang dans la poche placée sur un agitateur à la main jusqu'à son remplissage (450 ml).
10. Serrer alors le nœud fortement
11. Prendre une pince à bords plats et stripper la tubulure sur 10 cm environ en remontant du nœud (vers l'aiguille) pour libérer la poche.
12. A partir de la tubulure strippée remplir les tubes pilotes
13. Enlever le garrot
14. Retirer l'aiguille de la veine en appliquant un tampon de coton sur le point de piqûre.
15. Agiter par plusieurs retournements le tube contenant l'anticoagulant
16. Poser un bandage sur le bras
17. Récupérer la poche et la placer à + 4 O C.
18. Récupérer et adresser les tubes pilotes respectivement en immunohématologie pour le prélèvement sur anticoagulant et en sérologie pour le prélèvement sur tube sec.

19. Enregistrer le n° de ce don sur le registre en apposant à côté l'étiquette correspondante
20. Enregistrer ce don sur une liasse composée de plusieurs folios et qui circulera entre les unités de validation, l'unité de distribution et le secrétariat des donateurs.