

**RAFARAMALALA Solofo Sarah**

**L'HEPATITE VIRALE C A TRAVERS LA PCR CHEZ LES USAGERS DE  
DROGUES INJECTABLES A MADAGASCAR**

**Thèse pour l'obtention du Diplôme d'Etat de Docteur en Médecine**

**UNIVERSITE D'ANTANANARIVO**

**FACULTE DE MEDECINE**

ANNEE : 2015

N° 8756

**L'HEPATITE VIRALE C A TRAVERS LA PCR CHEZ LES USAGERS DE  
DROGUES INJECTABLES A MADAGASCAR**

**THESE**

Présentée et soutenue publiquement le 17 décembre 2015 à Antananarivo

Par

Madame RAFARAMALALA Solofo Sarah

Née le 02 juin 1987 à Itaosy

Pour obtenir le grade de

« DOCTEUR EN MEDECINE »

(Diplôme d'Etat)

Directeur de Thèse : Professeur RAZANAKOLONA Lala Rasoamialy-Soa

**MEMBRES DU JURY**

Président : Professeur RASAMINDRAKOTROKA Andry

Juges : Professeur RAKOTO ALSON Aimée Olivat

Professeur RAMAROZATOVO Lala

Rapporteur : Docteur RANDRIAMAHAZO Rakotomalala Toky



MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

FACULTE DE MEDECINE

Tel/Fax : 22 277 04 - BP. 375 Antananarivo  
E-mail : facultedemedecine\_antananarivo@yahoo.fr

## I. CONSEIL DE DIRECTION

**A. DOYEN**

Pr. ANDRIAMANARIVO Mamy Lalatiana

**B. VICE-DOYENS**

♦ **Médecine Humaine**

- Troisième Cycle Long (Internat Qualifiant, Clinicat, Agrégation et Formations Professionnalisantes)

Pr. RANDRIAMAROTIA Harilalaina Willy Franck  
Pr. RANTOMALALA Harinirina Yoël Honora

- Scolarité

- 1<sup>er</sup> et 2<sup>ème</sup> cycles et communication

Pr. RAHARIVELO Adeline  
Pr. VOLOLONTIANA Hanta Marie Danielle

- 3<sup>ème</sup> cycle court (stage interne, examens de clinique et thèses)

- Téléenseignement, LMD et projets
- Recherche

Pr. ROBINSON Annick Lalaina  
Pr. SOLOFOMALALA Gaëtan Duval  
Pr. RAVELOSON Nasolotsiry Enintsoa

♦ **Pharmacie**

Pr. SAMISON Luc Hervé

♦ **Médecine Vétérinaire**

Pr. RATSIMBAZAFIMAHEFA RAHANTALALAO  
Henriette

**C. SECRETAIRE PRINCIPAL**

- Administration Générale et Finances

M. RANDRIANJAFIARIMANANA Charles Bruno

## II. CONSEIL D'ETABLISSEMENT

**PRESIDENT**

Pr. RATSIMBAZAFIMAHEFA RAHANTALALAO  
Henriette

## III. CHEFS DE DEPARTEMENT

Biologie  
Chirurgie  
Médecine  
Mère et Enfant  
Pharmacie  
Santé Publique  
Sciences Fondamentales et Mixtes  
Tête et cou  
Vétérinaire

Pr. RAKOTO ALSON Aimée Olivat  
Pr. RANTOMALALA Harinirina Yoël Honora  
Pr. RABEARIVONY Nirina  
Pr. ANDRIANAMPANALINARIVO HERY Rakotovao  
Dr. RAOELISON Guy Emmanuel  
Pr. RAKOTOMANGA Jean de Dieu Marie  
Pr. AHMAD Ahmad  
Pr. RAZAFINDRABE John Alberto Bam  
Pr. RAFATRO Herintsoa

#### IV. CONSEIL SCIENTIFIQUE

**PRESIDENT**

Pr. ANDRIAMANARIVO Mamy Lalatiana

#### V. COLLEGE DES ENSEIGNANTS

**A- PRESIDENT**

Pr. RAJAONARISON Bertille Hortense

**B- ENSEIGNANTS PERMANENTS**

**B-1- PROFESSEURS TITULAIRES D'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE RECHERCHE**

##### **DEPARTEMENT BIOLOGIE**

- Hématologie Biologique
- Immunologie
- Parasitologie

Pr. RAKOTO ALSON Aimée Olivat  
Pr. RASAMINDRAKOTROKA Andry  
Pr. RAZANAKOLONA Lala Rasoamialy Soa

##### **DEPARTEMENT CHIRURGIE**

- Chirurgie Cardio-vasculaire
- Chirurgie Générale
- Chirurgie Pédiatrique
- Chirurgie Thoracique
- Chirurgie Viscérale
- Orthopédie Traumatologie
- Urologie Andrologie

Pr. RAVALISOA Marie Lydia Agnès  
Pr. RAKOTO-RATSIMBA Hery Nirina  
Pr. ANDRIAMANARIVO Mamy Lalatiana  
Pr. RAKOTOVAO Hanitrana Jean Louis  
Pr. SAMISON Luc Hervé  
Pr. RAKOTOARIJAONA Armand Herinirina  
Pr. RAZAFIMAHANDRY Henri Jean Claude  
Pr. SOLOFOMALALA Gaëtan Duval  
Pr. RANTOMALALA Harinirina Yoël Honora

##### **DEPARTEMENT MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES**

- Cardiologie
- Dermatologie Vénérologie
- Endocrinologie et métabolisme
- Hépatogastro-Entérologie
- Maladies Infectieuses
- Néphrologie
- Neurologie
- Psychiatrie
- Radiothérapie - Oncologie Médicale

Pr. RABEARIVONY Nirina  
Pr. RAPELANORO RABENJA Fahafahantsoa  
Pr. RAMAHANDRIDONA Georges  
Pr. RAMANAMPAMONJY Rado Manitrana  
Pr. RANDRIA Mamy Jean de Dieu  
Pr. RAJAONARIVELO Paul  
Pr. RABENANTOANDRO Rakotomanantsoa  
Pr. RANDRIAMAROTIA Harilalaina Willy Franck  
Pr. TEHINDRAZANARIVELO Djacoba Alain  
Pr. RAHARIVELO Adeline  
Pr. RAJAONARISON Bertille Hortense  
Pr. RAFARAMINO RAZAKANDRAINIA Florine

##### **DEPARTEMENT MERE ET ENFANT**

- Gynécologie Obstétrique
- Pédiatrie

Pr. ANDRIANAMPANALINARIVO HERY Rakotovao  
Pr. RAVELOMANANA RAZAFIARIVAO Noëline  
Pr. RAOBIJAONA Solofoniaina Honoré  
Pr. ROBINSON Annick Lalaina

**DEPARTEMENT SANTE PUBLIQUE**

- Administration et Gestion Sanitaire

Pr. RATSIMBAZAFIMAHEFA RAHANTALALAO

Henriette

- Education pour la Santé

Pr. ANDRIAMANALINA Nirina Razafindrakoto

- Santé Communautaire

Pr. RANDRIANARIMANANA Dieudonné

- Santé Familiale

Pr. RANJALAHY RASOLOFOMANANA Justin

- Statistiques et Epidémiologie

Pr. RAKOTOMANGA Jean de Dieu Marie

**DEPARTEMENT SCIENCES FONDAMENTALES ET MIXTES**

- Anatomie Pathologique

Pr. RANDRIANJAFISAMINDRAKOTROKA

Nantenaina Soa

- Radiodiagnostic et Imagerie Médicale

Pr. AHMAD Ahmad

**DEPARTEMENT TETE ET COU**

- Neurochirurgie

Pr. ANDRIAMAMONJY Clément

Pr. RABARIJAONA Mamiarisoa

- Ophtalmologie

Pr. ANDRIANTSOA RASOAVELONORO Violette

Pr. BERNARDIN Prisca

- Stomatologie et Chirurgie Maxillo-Faciale

Pr. RAZAFINDRABE John Alberto Bam

**DEPARTEMENT VETERINAIRE**

- Pharmacologie

Pr. RAFATRO Herintsoa

**B-2- PROFESSEURS D'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE RECHERCHE****DEPARTEMENT CHIRURGIE**

- Chirurgie Pédiatrique

Pr. HUNALD Francis Allen

- Urologie Andrologie

Pr. RAKOTOTIANA Auberlin Felantsoa

**DEPARTEMENT MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES**

- Cardiologie

Pr. RAKOTOARIMANANA Solofonirina

- Dermatologie Vénérologie

Pr. RAMAROZATOVO Lala Soavina

- Maladies Infectieuses

Pr. ANDRIANASOLO Radonirina Lazasoa

- Médecine Interne

Pr. VOLOLONTIANA Hanta Marie Danielle

- Néphrologie

Pr. RANDRIAMANANTSOA Lova Narindra

- Réanimation Médicale

Pr. RAVELOSON Nasolotsiry Enintsoa

**DEPARTEMENT MERE ET ENFANT**

- Gynécologie Obstétrique

Pr. RANDRIAMBELOMANANA Joseph Anderson

**DEPARTEMENT SANTE PUBLIQUE**

Pr. ANDRIANASOLO Roger

**DEPARTEMENT SCIENCES FONDAMENTALES ET MIXTES**

- Physiologie

Pr. RAKOTOAMBININA Andriamahery  
Benjamin

### **B-3- MAITRES DE CONFERENCES**

#### **DEPARTEMENT BIOLOGIE**

- Immunologie

Dr. RAJAONATAHINA Davidra Hendrison

#### **DEPARTEMENT MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES**

- Endocrinologie et Métabolisme

Dr. RAKOTOMALALA Andrinirina Dave Patrick

- Neurologie

Dr. ZODALY Noël

- Pneumo-phthisiologie

Dr. RAKOTOMIZAO Jocelyn Robert

Dr. RAKOTOSON Joëlson Lovaniaina

#### **DEPARTEMENT MERE ET ENFANT**

- Gynécologie Obstétrique

Dr. RASOLONJATOVO Jean de la Croix

#### **DEPARTEMENT CHIRURGIE**

- Chirurgie Thoracique

Dr. RAKOTOARISOA Andriamihaja Jean Claude

#### **DEPARTEMENT SANTE PUBLIQUE**

- Santé Publique

Dr. RANDRIAMANJAKA Jean Rémi

Dr. RATSIMBASOA Claude Arsène

Dr. RAKOTONIRINA El-C Julio

#### **DEPARTEMENT VETERINAIRE**

- Sciences Ecologiques, Vétérinaires

Agronomiques et Bioingenieries

Dr. RAHARISON Fidiniaina Sahondra

- Evolution - Ecologie - Paléontologie -

Dr. RASAMOELINA Andriamanivo

Ressources Génétiques -

Harentsoaniaina

#### **DEPARTEMENT PHARMACIE**

- Pharmacologie Générale

Dr. RAMANITRAHASIMBOLA David

- Pharmacognosie

Dr. RAOELISON Emmanuel Guy

- Biochimie Toxicologie

Dr. RAJEMIARIMOELISOA Clara Fredeline

- Chimie Organique et Analytique

Dr. RAKOTONDRAMANANA

Andriamahavola Dina Louisino

#### **DEPARTEMENT SCIENCES FONDAMENTALES ET MIXTES**

- Biophysique

Dr. RASATA Ravelo Andriamparany

### **B-4- ASSISTANTS**

#### **DEPARTEMENT VETERINAIRE**

- Virologie

Dr. KOKO

- Technologie

Mme. RAHARIMALALA Edwige Marie Julie

#### **DEPARTEMENT PHARMACIE**

- Procédés de Production, Contrôle et

Qualité des Produits de Santé

Dr. RAVELOJAONA RATSIMBAZAFIMAHEFA

Hanitra Myriam



## C- ENSEIGNANTS NON PERMANENTS

### C-1- PROFESSEURS EMERITES

Pr. ANDRIANANDRASANA Arthur  
Pr. ANDRIANARISOA Ange Christophe Félix  
Pr. AUBRY Pierre  
Pr. RABARIOELINA Lala  
Pr. RABENANTOANDRO Casimir  
Pr. RABETALIANA Désiré  
Pr. RADESA François de Sales  
Pr. RAJAONA Hyacinthe  
Pr. RAKOTOMANGA Robert  
Pr. RAKOTOMANGA Samuel

Pr. RAKOTO - RATSIMAMANGA S. U  
Pr. RAKOTOZAFY Georges  
Pr. RAMAKAVELO Maurice Philippe  
Pr. RAMONJA Jean Marie  
Pr. RANDRIAMAMPANDRY  
Pr. RANDRIANASOLO Jean Baptiste Olivier  
Pr. RANDRIARIMANGA Ratsiatery Honoré Blaise  
Pr. RATSIVALAKA Razafy  
Pr. RAZANAMPARANY Marcel  
Pr. ZAFY Albert

### C-2- CHARGE D'ENSEIGNEMENT

#### DEPARTEMENT CHIRURGIE

- Chirurgie Générale

Pr. RAVELOSON Jean Roger

#### DEPARTEMENT TETE ET COU

- ORL et Chirurgie Cervico-Faciale

Pr. RAKOTO Fanomezantsoa Andriamparany

## VI. SERVICES ADMINISTRATIFS

### CHEFS DE SERVICES

AFFAIRES GENERALES

M. RANDRIANARISOA Rija Hanitra

COMPTABILITE

M. RATSIMBAZAFIARISON Nivson Espérant

PERSONNEL

Mme. RAKOTOARIVELO Liva Harinivo Vonimbola

SCOLARITE

Mme. SOLOFOSAONA R. Sahondranirina

TROISIEME CYCLE LONG

Mme. RANIRISOA Voahangy

## VII. IN MEMORIAM

Pr. RAMAHANRIARIVELO Johnson  
Pr. RAJAONERA Frédéric  
Pr. ANDRIAMASOMANANA Veloson  
Pr. RAKOTOSON Lucette  
Pr. ANDRIANJATOVO RARISOA Jeannette  
Dr. RAMAROKOTO Razafindramboa  
Pr. RAKOTOBÉ Alfred  
Pr. ANDRIAMIANDRA Aristide  
Dr. RAKOTONANAHARY  
Pr. ANDRIANTSEHENO Raphaël  
Pr. RANDRIAMBOLOLONA Robin  
Pr. RAMANANIRINA Clarisse  
Pr. RALANTOARITSIMBA Zhouder  
Pr. RANIVOALISON Denys  
Pr. RAKOTOVAO Rivo Andriamiadana  
Pr. RAVELOJAONA Hubert  
Pr. ANDRIAMAMPIHANTONA Emmanuel  
Pr. RANDRIANONIMANDIMBY Jérôme  
Pr. RAKOTONIAINA Patrice  
Pr. RAKOTO-RATSIMAMANGA Albert  
Pr. RANDRIANARISOLO Raymond  
Dr. RABEDASY Henri  
Pr. MAHAZOASY Ernest  
Pr. RATSIFANDRIHAMANANA Bernard  
Pr. RAZAFINTSALAMA Charles

Pr. RANAIVOARISON Milson Jérôme  
Pr. RASOLONJATOVO Andriananja Pierre  
Pr. MANAMBELONA Justin  
Pr. RAZAKASOA Armand Emile  
Pr. RAMIALIHARISOA Angeline  
Pr. RAKOTOBÉ Pascal  
Pr. RANAIVOZANANY Andrianady  
Pr. RANDRIANARIVO  
Pr. RAKOTOARIMANANA Denis Roland  
Pr. ANDRIAMANANTSARA Lambosoa  
Pr. RAHAROLAHY Dhels  
Pr. ANDRIANJATOVO Jean José  
Pr. ANDRIANAIVO Paul Armand  
Pr. RANDRIAMBOLOLONA RASOAZANANY Aimée  
Pr. RATOVO Fortunat  
Pr. GIZY Ratiambahoaka Daniel  
Pr. RASOLOFONDRAIBE Aimé  
Dr. RAZAKAMANIRAKA Joseph  
Pr. ANDRIANJATOVO Joseph  
Pr. RAHARIJAONA Vincent Marie  
Pr. RAKOTOVAO Joseph Dieudonné  
Pr. KAPISY Jules Flaubert  
Pr. ANDRIAMBAO Damasy Seth  
Pr. FIDISON Augustin

## DEDICACES

Je dédie ce travail :

- **A la gloire de Dieu Tout Puissant,**

« Seigneur mon Dieu, pour moi, tu as fait tant de choses étonnantes, de si beaux projets, personne n'est égale à toi ! Je veux te dire merci sans oublier un seul de tes bienfaits »

Psaume 40 : 6, Psaumes 103 : 2

- **A mes chers parents**

Pour tant d'années de sacrifices durant lesquelles vous m'avez apporté vos soutiens matériel et moral. Puissiez-vous trouver dans ce modeste travail le fruit de vos efforts et le témoignage de tout mon amour.

Merci Dada sy Neny!

- **A mon mari MAMPIANINA Andrianeloavinaet à nos futurs enfants (Steffi ...)**

Qui m'a soutenue avec amour et compréhension durant ces longues et dures années d'études.

Merci de m'avoir tant aimé

- **A mes frères, sœurs, beaux-frères et belles sœurs surtout à toi Leblanc, Donie et Léa**

Pour tous les soutiens que vous m'avez apportés durant mes études et durant la préparation de cette soutenance de thèse.

Ma réussite est les vôtres !

- **A mes neveux et nièces**

Je vous souhaite un meilleur avenir.

- **A toute ma famille**

Mes vifs remerciements.

- **A tous mes amis de la Promotion Faniahy et mes amis les « chux »**

Nos grands souvenirs ! Que les liens qui nous unissent durent indéfiniment !

- **A tous mes aînés et collègues de la biologie médicale surtout Njaka, Tsiry, Nomena, Elodie**

Merci !

- **A tous mes amis de l'IQ 18eme Promotion**

- **A tous ceux qui, de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail**

Je vous adresse mes sincères remerciements



**A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE**

**Monsieur le Docteur RASAMINDRAKOTROKA Andry**

Professeur Titulaire d'Enseignement Supérieur et de Recherche en Immunologie  
à la Faculté de Médecine d'Antananarivo  
Ancien ministre de la Santé Publique

*La spontanéité et la gentillesse avec lesquelles vous avez accueilli et accepté notre  
requête de présider cette thèse nous vont droit au cœur.*

*Veuillez croire à notre profonde et notre plus grande estime.*

**A NOTRE MAITRE ET DIRECTEUR DE THESE**

Madame le Docteur RAZANAKOLONA Lala Rasoamialy-Soa  
Professeur Titulaire d'Enseignement Supérieur et de Recherche en Parasitologie  
et Mycologie Médicales à la Faculté de Médecine d'Antananarivo  
Chef de Service du Laboratoire National de Référence de Madagascar

*Vous nous faites un grand honneur de diriger cette thèse et de nous avoir consacré une  
partie de votre précieux temps.*

*Veillez trouver ici le témoignage de nos sentiments les plus respectueux ainsi que  
l'expression de notre profonde reconnaissance*

## **A NOS MAITRES ET HONORABLES JUGES DE THESE**

Madame le Docteur RAKOTO ALSON Aimée Olivat  
Professeur Titulaire d'Enseignement Supérieur et de Recherche en Hématologie  
à la Faculté de Médecine d'Antananarivo  
Chef du département Biologie à la Faculté de Médecine d'Antananarivo

*C'est un grand honneur que vous nous faites en acceptant de siéger parmi les membres du jury.*

*Veillez trouver ici l'expression de notre plus haute considération et nos plus vifs remerciements.*

## **A NOTRE RAPPORTEUR DE THESE**

**Monsieur le Docteur RANDRIAMAHAZO Rakotomalala Toky**  
Médecin Spécialiste en Biologie Médicale  
Chef de travaux en Immunologie

*Veillez retrouver ici mes plus vifs remerciements pour votre accueil et votre grande disponibilité. Vous nous avez bien conseillé et dirigé tout au long de notre travail.  
Nos remerciements pour votre dévouement.*

**A NOTRE MAITRE ET DOYEN DE LA FACULTE DE MEDECINE  
D'ANTANANARIVO**

**Monsieur le Professeur ANDRIAMANARIVO Mamy Lalatiana**

*Nos hommages les plus respectueux.*

**A NOS MAITRES DE LA FACULTE DE MEDECINE D'ANTANANARIVO**

*En reconnaissance de leurs précieux enseignements.*

**A TOUT LE PERSONNEL ADMINISTRATIF ET TECHNIQUE DE LA  
FACULTE DE MEDECINE D'ANTANANARIVO**

*Nos sincères remerciements.*

**A MADAME LE CHEF DE SERVICE ET A TOUT LE PERSONNEL DU SLNR  
ANALAKELY ANTANANARIVO**

*Nos sincères remerciements.*

**A TOUS CEUX QUI, DE PRES OU DE LOIN, ONT PRIE POUR QUE MES  
TRAVAUX DE RECHERCHE ARRIVENT A TERMES**

*Nos remerciements infinis.*

## SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION .....	1
PREMIERE PARTIE : RAPPELS	
I- I-RAPPELS SUR L'HEPATITE VIRALE C .....	2
I-1 ASPECTS VIROLOGIQUES DU VIRUS DE L'HEPATITE C .....	2
I-1-1 Structure des particules virales.....	2
I-1-2 Structure du génome .....	3
I-1-3 Cycle de multiplication du virus de l'hépatite virale .....	4
I-1-4 Génotypes viraux .....	5
I-2 EPIDEMIOLOGIE DU VIRUS DE L'HEPATITE C .....	5
I-2-1 Mode de transmission.....	5
I-2-1-1 Transmission par la toxicomanie injectable.....	5
I-2-1-2 Transmission par transfusion sanguine.....	6
I-2-1-3 Transmission nosocomiale ou iatrogène.....	6
I-2-1-4 Transmission sexuelle.....	6
I-2-1-5 Transmission materno-fœtale .....	6
I-2-2 Histoire naturelle de l'hépatite virale C .....	7
I-3 POUVOIR PATHOGENE DU VIRUS DE L'HEPATITE VIRALE .....	7
I-3-1 Physiopathologie et tropisme viral.....	7
I-3-2 Clinique de l'hépatite virale C .....	8
I-3-2-1 Hépatite virale aigüe C .....	8
I-3-2-2 Hépatite chronique C .....	8

I-4 DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE L'HEPATITE VIRALE C .....	9
I-4-1 Tests sérologiques .....	9
I-4-2 Amplification génomique par PCR .....	9
I-5 TRAITEMENT ET PHOPHYLAXIE DE L'HEPATITE VIRALE C .....	9
 II- RAPPELS SUR LA TECHNIQUE PCR	
II-1 Définition de la PCR .....	10
II-2 Procédure de la PCR .....	10
II-3 Différents types de PCR.....	12
II-3-1 Amplification de la cible.....	12
II-3-2 Amplification du signal .....	12
II-4 Technologies de détection.....	13
II-4-1 Agents se liant à l'ADN double brin.....	13
II-4-2 Hydrolyse de sondes .....	14
II-5 Cycle seuil.....	15

## DEUXIEME PARTIE : METHODES ET RESULTATS

I- METHODES	
I-1 Cadre de l'étude .....	17
I-2 Type et période d'étude.....	18
I-3 Population d'étude.....	18
I-4 Critères d'inclusion .....	18
I-5 Critères de non inclusion.....	18
I-6 Critères de positivité.....	18
I-7 Mode et taille d'échantillonnage .....	19



I-8 Variables étudiées .....	19
I-9 Limites de l'étude.....	19
I-10 Considérations éthiques.....	20
I-11 Méthodologie .....	20
I-12 Techniques utilisées .....	20
I-12-1 ELISA.....	20
I-12-1-1 Appareil utilisé.....	20
I-12-1-2 Réactifs et consommables.....	21
I-10-1-3 Procédure du test ELISA .....	21
I-10-1-4 Interprétation des résultats et contrôle qualité .....	21
I-12-2 PCR .....	23
I-12-2-1 Appareil utilisé.....	23
I-12-2-2 Equipements et consommables.....	23
I-12-2-3 Procédure de la PCR.....	24
I-12-2-4 Lecture des résultats .....	24
II- RESULTATS .....	25
III-1 Séroprévalence de l'infection par VHC chez les UDI.....	25
III-2 Répartition de l'hépatite virale C selon la région .....	26
II-3 Répartition de l'hépatite virale C selon la charge virale.....	27
II-4 Répartition de l'hépatite virale C selon la densité optique de l'ELISA et selon la charge virale .....	28

## TROISIEME PARTIE : DISCUSSION

I-	Prévalence globale de l'hépatite virale C .....	29
II-	Prévalence de l'hépatite virale C chez les usagers de drogues injectables .....	31
III-	Répartition de l'hépatite virale C chez les usagers de drogues injectables selon la région .....	33
IV-	Répartition de l'hépatite virale C chez les usagers de drogues injectables selon la charge virale de la PCR.....	35
V-	Répartition de l'hépatite virale C chez les usagers de drogues injectables selon la densité optique de l'ELISA et selon la charge virale.....	37
VI-	Techniques utilisées pour le dépistage de l'hépatite virale C .....	38
VII-	Limites de l'étude.....	43

CONCLUSION .....	45
------------------	----

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## ANNEXES

## LISTE DES FIGURES

	<b>Pages</b>
<b>Figure 1:</b> Structure schématique de la particule virale VHC .....	02
<b>Figure 2:</b> Organisation génomique du VHC .....	03
<b>Figure 3:</b> Cycle réplcatif du VHC.....	04
<b>Figure 4:</b> Arbre phylogénique du VHC .....	05
<b>Figure 5:</b> Histoire naturelle de l'hépatite C .....	07
<b>Figure 6:</b> Les différentes étapes au cours d'un cycle de CR.....	11
<b>Figure 7:</b> Agents se liant à l'ADN double brin.....	14
<b>Figure 8:</b> Hydrolyse de sondes .....	15
<b>Figure 9:</b> Modèle graphique de la PCR en temps réel .....	16
<b>Figure 10 :</b> Institut d'hygiène Analakely, Antananarivo .....	17
<b>Figure 11:</b> Séroprévalence de l'HVC chez les UDI au SLNR en 2012.....	25
<b>Figure 12:</b> Répartition de l'infection par VHC chez les UDI au SLNR en 2012 selon la région .....	26
<b>Figure 13:</b> Répartition de l'infection par VHC chez les UDI au SLNR en 2012 selon la charge virale .....	27
<b>Figure 14:</b> Répartition de l'infection par VHC chez les UDI au SLNR en 2012 selon la densité optique et selon la charge virale .....	28
<b>Figure 15:</b> Temps écoulé entre le moment d'une infection aiguë par le VHC et sa détection par divers tests analytiques .....	39
<b>Figure 16:</b> Fourchettes approximatives de détection de l'ARN du VHC .....	41

## **LISTE DES ANNEXES**

- Annexe 1:** Automate ASYS Expert
- Annexe 2:** Kit Anti HCV ELISA 4th Gen Fortress Diagnostics Limited ®  
(United Kingdom)
- Annexe 3:** Procédure du test ELISA
- Annexe 4:** Automate COBAS Ampliprep
- Annexe 5:** Automate COBAS Taqman 48
- Annexe 6:** Procédure de la PCR

## LISTE DES ABREVIATIONS

Ac	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ag	Antigène
ALAT	Alanine amino - transférase
ARN	Acide ribonucléique
BAAR	Bacille alcolo-acido-résistant
CHC	Carcinome hépatocellulaire
CLDN1	Claudin-1
CHU-JRA	Centre hospitalier universitaire Joseph RavoahangyAndrianavalona
DO	Densité optique
ELISA	Enzyme LinkedImmunoSorbentAssay
GAGs	Glycoaminoglycanes
HLA	Human leukocyte antigen
LDR	Light Dependent Resistor
Ig	Immunoglobulines
OCLN	Occludines
OMS	Organisation mondiale de la santé
RE	Réticulum endoplasmique
<b>SR-B1</b>	Récepteur cellulaire scavenger classe B site
VHB	Virus de l'hépatite B
VHC	Virus de l'hépatite C
VIH	Virus de l'immunodéficience Humaine
VLDL	Very low density lipid
UDI	Usager de drogue injectable
PCR	Polymerase chain reaction

## **INTRODUCTION**



## INTRODUCTION

L'infection par le virus de l'hépatite C est une maladie causée par un virus enveloppé à ARN de polarité positive qui infecte essentiellement les hépatocytes.

C'est une pathologie fréquente car selon l'OMS, 200 millions de sujets sont infectés dans le monde, soit une prévalence de 3% [1]. Elle est grave puisqu'elle est d'évolution chronique dans 80% des cas, responsable de cirrhose hépatique dans 10% des cas sur 10 à 15 ans [2].

L'infection par le virus de l'hépatite C est devenue la principale indication de transplantation hépatique et sera très bientôt la principale cause de carcinome hépatocellulaire dans les pays industrialisés [3].

Le virus de l'hépatite C se transmet principalement par le sang dans 60 à 70% des cas et la toxicomanie intraveineuse est la source majeure de contamination dans le monde. A Madagascar, cette étude constitue la première étude de l'hépatite virale C chez les drogués.

La recherche des anticorps anti-VHC par un test ELISA est un test de première intention lors du diagnostic d'une infection par le VHC, malgré les limites de ce test pour différencier une hépatite C chronique d'une infection ancienne. La recherche de l'ARN viral par PCR, actuellement le seul outil de diagnostic capable de les distinguer, ne peut être utilisé en première intention dans les pays en voie de développement comme Madagascar en raison de son coût.

L'objectif de cette étude était de déterminer la prévalence de l'hépatite virale C chez les usagers de drogues injectables à Madagascar permettant de déterminer l'importance de la PCR au cours de l'hépatite virale C et de proposer des suggestions pour améliorer la prise en charge de l'hépatite C à Madagascar.

Notre étude comprend trois parties :

- La première partie se rapporte aux rappels théoriques de l'HVC et la technique PCR
- La deuxième partie décrit les matériels et la méthode que nous avons utilisés. C'est dans cette partie que les résultats seront également présentés,
- Dans la troisième partie seront exposées les discussions, nos suggestions ainsi que la conclusion de notre travail.

## **PREMIERE PARTIE : RAPPELS THEORIQUES**

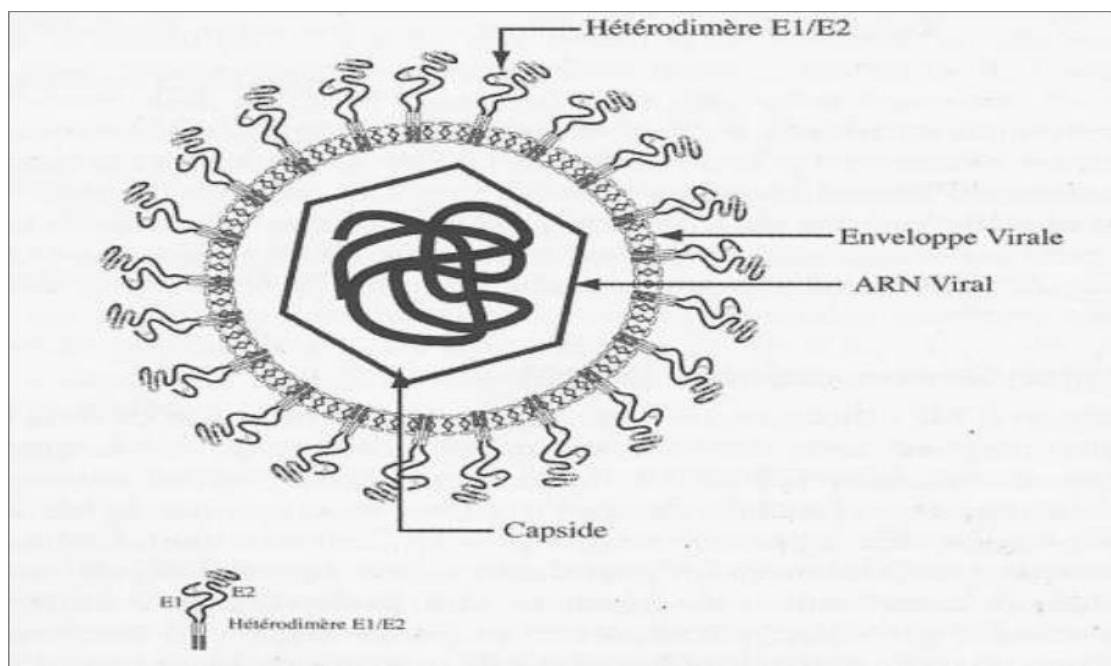
## PREMIERE PARTIE : RAPPELS THEORIQUES

### I-RAPPELS SUR L' HEPATITE VIRALE C

#### I-1 ASPECTS VIROLOGIQUES DU VIRUS DE L'HEPATITE C

##### I-1-1 Structure des particules virales

Le VHC appartient à la famille des *Flaviviridae*, au genre *Hepacivirus*, c'est un petit virus enveloppé de 55 à 65 nm de diamètre, très difficilement visualisé en microscopie électronique. Le génome viral, constitué d'une molécule d'ARN simple brin de polarité positive, est contenu dans une capside protéique à symétrie icosaédrique qui est elle-même entourée d'une enveloppe lipidique d'origine cellulaire au sein de laquelle sont ancrées deux glycoprotéines d'enveloppe virales, E1 et E2, organisées en complexes hétérodimériques non covalents [5] ( figure 1).



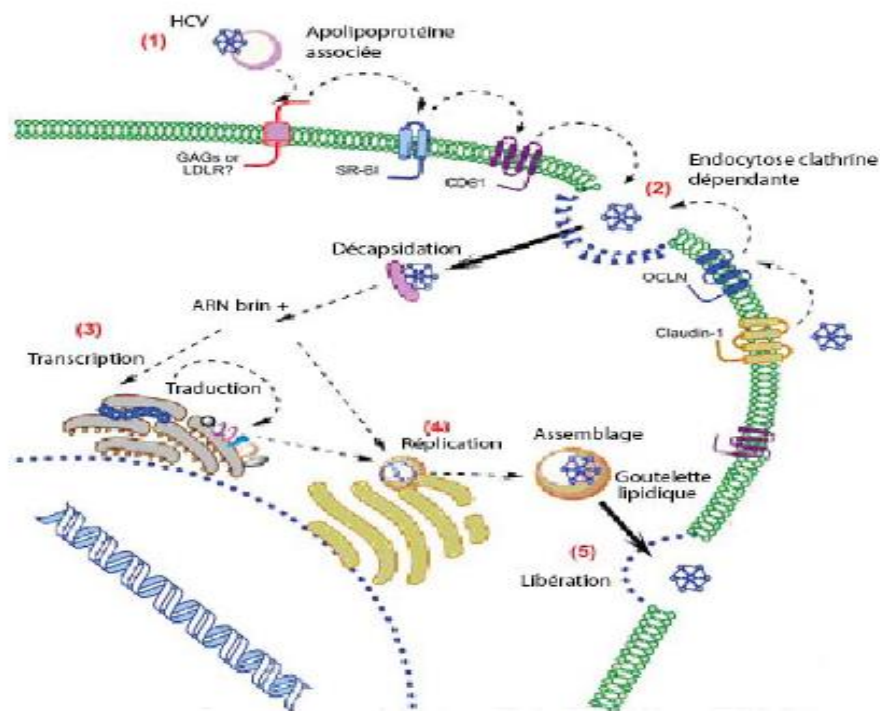
**Figure 1 :** Structure schématique de la particule virale VHC

**Source :** Gordien E. Virus de l'hépatite C : dynamique, réplication intracellulaire. Elsevier SAS. 2003 :13-26.

**Source :** Serasin F, Krol J et al. Decreased levels of microRNA miR-122 in individuals with hepatitis C responding poorly to interferon therapy. *Nat Med.* 2009;15(1):31-3.

### I-1-3 Cycle de multiplication du virus de l'hépatite virale C

Les virions VHC, libres ou associés à des apolipoprotéines, interagissent en cascade avec de nombreux récepteurs présents à la surface des hépatocytes des GAGs et des LDR. Le SR-B1) [7] formerait avec le récepteur cellulaire CD81 [8] un complexe permettant le transfert du VHC au niveau des jonctions serrées permettant l'interaction du virus avec des protéines de jonctions serrées: CLDN1) et OCLN [9]. Ces dernières facilitent l'internalisation du VHC par endocytose des récepteurs de surface liés aux particules VHC, via une voie clathrine dépendante. Dans les endosomes, le faible pH déclenche la fusion de l'enveloppe virale avec les membranes endosomales et la libération de l'ARN génomique dans le cytoplasme. La transcription des brins d'ARN de polarité positive peut alors débuter avec la synthèse d'un brin d'ARN complémentaire de polarité. L'assemblage des particules virales à l'interface du RE et des organelles de stockage des matières grasses appelées « gouttelettes lipidiques. Ils sont ensuite libérés dans la lumière du RE et rélargués à l'extérieur de la cellule par la



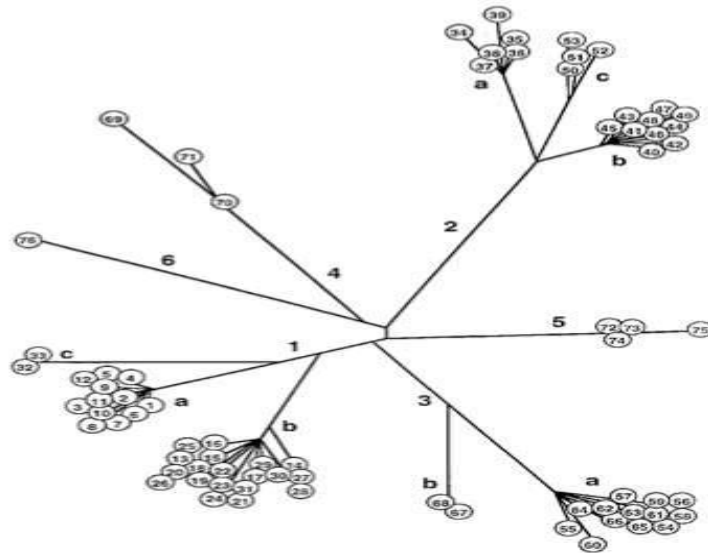
voie de sécrétion des VLDL [10] (figure 3)

**Figure 3 :** Cycle réplcatif du VHC

**Source :** Boonstra A, Laan LJ et al. Experimental models for hepatitis C viral infection. *Hepatology* 2009;50(5):1646-55

### I-1-4 Génotypes viraux

L'analyse phylogénique de séquences nucléotidiques de souches virales isolées dans différentes régions du monde a permis de classer ces souches en six principaux groupes appelés génotypes, numérotés de 1 à 6. On distingue également, au sein de ces génotypes, plus d'une centaine de sous-types, identifiés par une lettre minuscule a, b et c (figure 4)



**Figure 4 :** Arbre phylogénique du VHC

**Source :** Asselah T, Marhilot M, Boyer N, Marcellin P. Variabilité génétique du virus de l'hépatite C: implications cliniques. Gastroenterol Clin Biol 2000 ; 24 : 175-184.

## I-2 EPIDEMIOLOGIE DU VIRUS DE L'HEPATITE C

### I-2-1 Mode de transmission

#### I-2-1-1 Transmission par la toxicomanie injectable

Le VHC se transmet principalement par le sang dans 60 à 70% des cas. La toxicomanie intraveineuse est la source majeure de contamination dans le monde. Le risque de contamination par aiguille souillée est 200 fois supérieur pour le virus C que pour le VIH. Le partage de seringues était très fréquent avant l'épidémie de VIH, persiste et la contamination pourrait être liée au partage de seringues lors des premières injections ou au cours d'une incarcération ou au partage du petit matériel nécessaire aux injections (filtre, cuillère). Le partage de paille utilisée pour « sniffer » est aussi un risque de contamination de l'infection par VHC car associé à des lésions de la muqueuse nasale [11, 12].



### **I-2-1-2 Transmission par transfusion sanguine**

La transfusion de sang ou de produits dérivés du sang a été un facteur majeur de contamination jusqu'en 1990. Les facteurs de risque de transfusion ont été liés à la prévalence de l'infection virale C chez les donneurs de sang, la date de transfusion, le nombre et le type de produits transfusés rendant compte de la fréquence de l'infection dans certains groupes comme les hémophiles ou les thalassémiques polytransfusés. Depuis 1991, il existe une chute du risque transfusionnel grâce aux mesures successives de dépistage des donneurs de sang [13].

### **I-2-1-3 Transmission nosocomiale ou iatrogène**

Le contact avec le sang infecté peut se produire lors d'actes invasifs et d'effractions cutanées avec des instruments ou des aiguilles souillés de sang infecté et insuffisamment désinfectés lorsqu'ils sont utilisés pour percer ou couper la peau. La contamination est possible lors des séances d'acupuncture si les aiguilles ne sont pas jetables, lors de la mésothérapie si le matériel n'est pas à usage unique et au cours de tatouage, piercing et dermographie [14].

### **I-2-1-4 Transmission sexuelle**

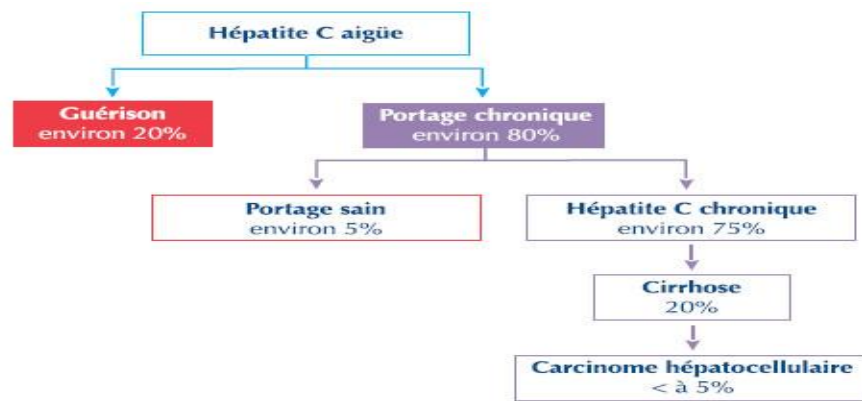
Le risque de transmission du virus de l'hépatite C par voie sexuelle est très faible. L'ARN du virus de l'hépatite C n'est pas retrouvé dans les sécrétions vaginales et très rarement dans le sperme avec une concentration dans ce cas de 10 à 100 fois inférieure par rapport au sang. En revanche, on retrouve le virus dans le sang menstruel et la contamination est donc possible, en particulier à l'occasion de rapports pendant les règles, en cas d'infections génitales (herpès) ou de lésions des organes sexuels. Certaines pratiques sexuelles traumatiques et sanglantes peuvent être responsables de la transmission du virus C [15, 16].

### **I-2-1-5 Transmission materno-fœtale**

Le virus se transmet de la mère infectée à son enfant au moment de l'accouchement, ce risque de transmission est estimé entre 5 et 6%. En cas de coinfection par le virus du Sida, il est alors beaucoup plus élevé à 20%. La majorité des études ont montré que l'ARN du VHC est indétectable dans le lait maternel. Il n'y a pas de risque de transmission du VHC lors de l'allaitement [17-19].

### I-2-2 Histoire naturelle de l'hépatite virale C

L'incubation est de 2 mois en moyenne. La forme aiguë est le plus souvent asymptomatique. Les formes ictériques sont rares et les formes fulminantes inexistantes ou tout à fait exceptionnelles. L'hépatite C évolue vers la chronicité dans plus de 70% des cas. L'atteinte hépatique, variable, est évaluée sur les biopsies selon la classification de Metavir. L'évolution de l'hépatite C vers la cirrhose est fréquente, 20% après 10 ans d'évolution d'une hépatite C chronique. Le risque de survenue d'un hépatocarcinome chez les sujets atteints d'une cirrhose associée à l'hépatite C est également élevé: 20% cinq ans après le diagnostic de cirrhose [20] (figure 5).



**Figure 5 :** Histoire naturelle de l'hépatite C

**Source :** <https://www.ccr.fr/sites/hepatite-C/site/maladie.htm>

## I-3 POUVOIR PATHOGENE DU VIRUS DE L'HEPATITE VIRALE

### I-3-1 Physiopathologie et tropisme viral

L'impact de la réponse immunitaire dans les mécanismes de persistance ou de clairance virale ou dans la genèse des lésions hépatiques est inconnu. L'infection chronique se développe malgré une forte réponse immune polyclonale humorale et cellulaire. L'importance des facteurs immunogénétiques de type HLA dans la clairance ou la persistance virale et dans la lésion hépatocytaire reste aussi inconnue. Il n'y a pas de relation clairement montrée entre l'importance de la charge virale et la sévérité de l'hépatopathie. Le tropisme du VHC n'est pas connu, en dehors des hépatocytes, et par analogie avec les *flavivirus* et *pestivirus*, il infecte les cellules mononuclées qui peuvent constituer un réservoir viral pour la récurrence infectieuse après transplantation hépatique [21].

### I-3-2 Clinique de l'hépatite virale C

#### I-3-2-1 Hépatite virale aiguë C

L'incubation est moyenne est de 7 à 8 semaines. La phase prodromique est rare. L'hépatite aiguë C n'est ictérique que dans une minorité de cas (20%) et est sans symptômes dans la plupart des cas (80%). Les symptômes ne sont pas spécifiques de 2 à 12 semaines : fatigue, nausées, douleurs de l'hypochondre droit, suivies par l'apparition d'urines foncées et d'un ictère [22].

**-Forme anictérique** : absence d'ictère mais le reste du tableau clinique et biologique est identique à la forme commune.

**-Forme cholestatique** : la cholestase est au premier plan du tableau biologique, s'accompagnant d'un ictère et d'un prurit intense [23].

**-Forme avec manifestations extra-hépatiques** : l'hépatite C peut s'accompagner de manifestations extra-hépatiques telles cryoglobulinémie mixte essentielle, porphyrie cutanée tardive, dysthyroïdie, lichen plan, syndrome sec, néphropathies glomérulaires, manifestations ostéoarticulaires [24].

**-Forme fulminante** : cette forme est rare et ne semble survenir que s'il existe un cofacteur comme la polychimiothérapie pour maladie de Hodgkin par exemple associé à l'infection virale C [25].

**-Evolution** : la guérison spontanée de l'hépatite aiguë C n'est observée que dans 20% des cas environ. Chez la plupart des patients, l'infection devient chronique. La fréquence du passage à la chronicité est de l'ordre de 80%.

#### I-3-2-2 Hépatite chronique C

Le passage à la chronicité est défini par une charge virale VHC restant positive supérieure à 6 mois. L'hépatite chronique persistante est une maladie bénigne qui ne nécessite aucun traitement. Les transaminases sont légèrement augmentées, les anticorps anti-HVC sont présents. L'hépatite chronique active risque d'évoluer vers une cirrhose et un carcinome hépatocellulaire avec un risque beaucoup grand que pour l'hépatite B [26].

## **I-4 DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE L'HEPATITE VIRALE C**

Le diagnostic de l'hépatite C s'effectue en routine sur deux types de tests.

### **I-4-1 Tests sérologiques**

Les tests de première génération étaient des tests ELISA permettant la détection d'anticorps spécifiques de protéines codées par la région NS4. D'autres tests, de deuxième et de troisième génération, sont commercialisés. Il s'agit des tests permettant la détection des anticorps spécifiques des protéines virales structurales (C22 de la capside) et non structurales (5.1.1, C100-3, C33.c et NS3) [27, 28].

### **I-4-2 Amplification génomique par PCR**

La technique permet la détection et aussi la quantification de l'ARN du VHC. La PCR permet aussi le clonage et l'analyse de la séquence en nucléotides de nombreux isolats du VHC permettant des analyses phylogénétiques, le développement de techniques de génotypage de routine [29].

## **I-5 TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE DE L'HEPATITE VIRALE C**

Le traitement repose sur l'association de deux antiviraux à action directe : le sofosbuvir et daclatasvir combinée ou non avec la ribavirine. La durée du traitement dépend du génotype viral allant de 24 à 48 semaines.

Il n'existe pas encore de vaccin contre cette infection. Ainsi, la prévention vise principalement à freiner la transmission du virus, en éliminant surtout les comportements à risque très élevé, tels le partage d'aiguilles et d'autre matériel d'UDI. Il importe aussi de prévenir la transmission du virus par le sang, les composants sanguins, les organes, les tissus ou le sperme, ainsi que par des pratiques médicales ou des soins de santé à risque et des articles d'hygiène personnelle contaminés [30].

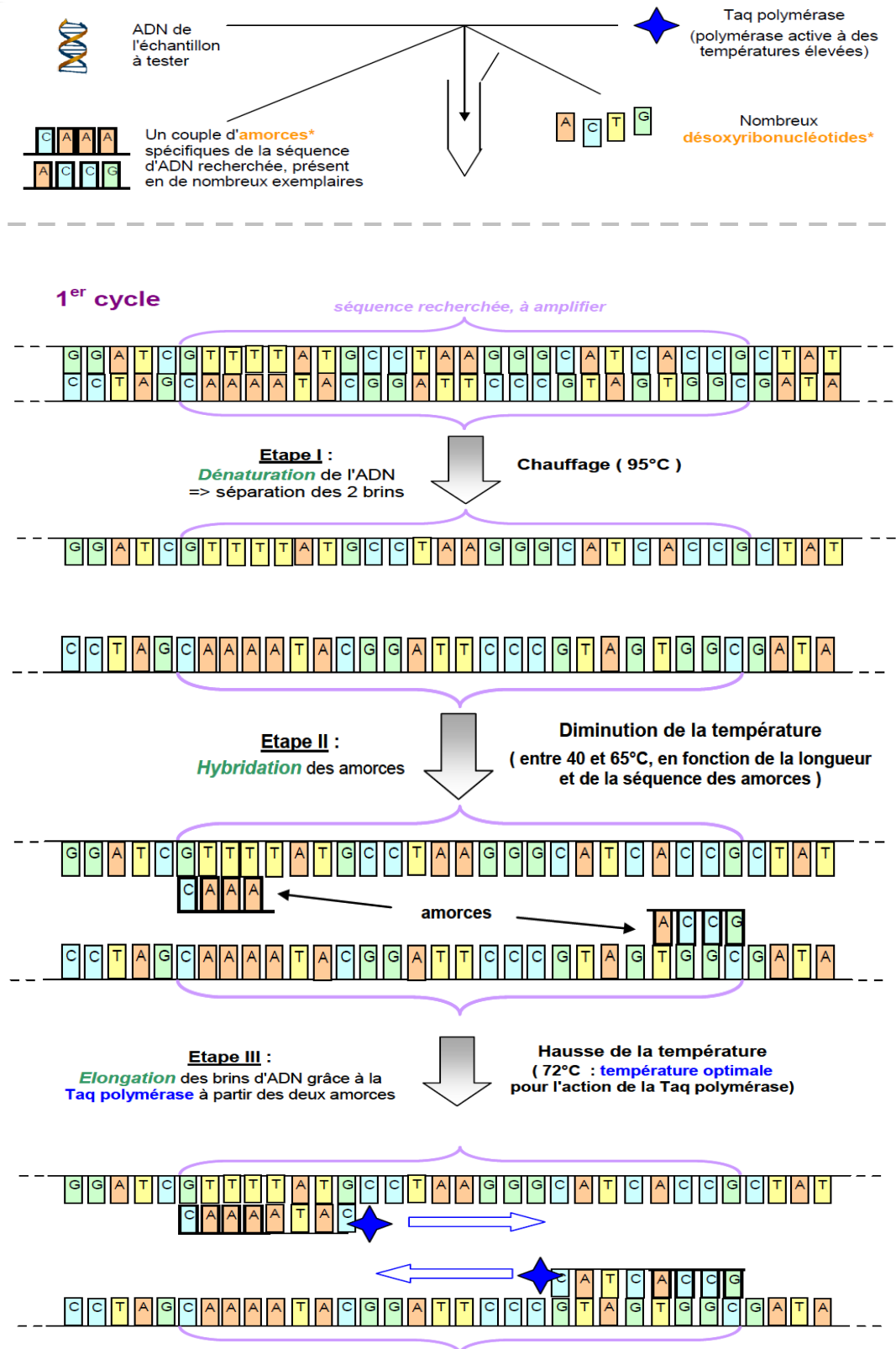
## **II-RAPPEL SUR LA TECHNIQUE PCR**

### **II-1 Définition de la PCR**

La PCR ou Polymerase Chain Reaction est une technique qui permet d'amplifier l'ADN ou l'ARN in vitro. Elle permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie.

### **II-2 Procédure de la PCR**

La PCR procède par cycles de température, chaque cycle pouvant être décomposé en trois étapes. La dénaturation s'effectue à une température supérieure nettement à 90°C et permet d'obtenir des matrices d'ADN simple brin. L'hybridation suit à une température nettement plus basse qui dépend beaucoup de l'expérience. Au cours de cette étape, les oligonucléotides de synthèse qui délimitent la séquence à amplifier s'apparient à la matrice simple brin. La température de cette étape doit être calculée précisément afin d'éviter les hybridations non spécifiques. Au terme de cette étape, des amorces de polymérisation sont formées. Elles pourront être complétées au cours de l'étape suivante, dite d'élongation, dont la température est généralement d'environ 72°C, s'achève un cycle au cours duquel la quantité d'ADN a pratiquement doublée. La disponibilité d'ADN polymérases thermorésistantes permet d'enchaîner plusieurs dizaines de ces cycles. Le cycle de PCR est répété de 20 à 50 fois dont n cycles de PCR permettent en théorie  $2^n$  copies de la séquence ciblée ( amplicon ) et il est possible d'obtenir plus d'un million de copies de la séquence d'ADN recherchée en une vingtaine de cycles [31].



**Figure 6 :** Les différentes étapes au cours d'un cycle de PCR

**Source :** <http://www.bibliomer.com>



## **II-3 Différents types de PCR**

### **II-3-1 Amplification de la cible**

Le principe consiste à synthétiser un grand nombre de copies du génome viral (ou amplicons) au cours de réactions enzymatiques cycliques. Les copies du génome viral sont ensuite détectées par différentes méthodes (PCR ou TMA) et la quantité de génome viral présente dans un échantillon peut ainsi être déterminée.

#### **II-3-1-1 PCR**

Elle utilise plusieurs températures et une seule enzyme thermostable au cours de chaque cycle de la réaction. Elle est réalisée directement après lyse ou extraction pour l'ADN du VHB, mais nécessite une étape préalable de transcription inverse pour l'ARN du VHC. Les amplicons synthétisés par PCR sont des ADN doubles brins. Comme exemples de ce type de technique: COBAS AMPLICOR HCV PCR-qualitatif et COBAS AMPLICOR HCV MONITOR-quantitatif-de Roche [32].

#### **II-3-1-2 Autres**

Amplification à médiation par transcription (TMA pour Transcription-mediated amplification, de Bayer) [33] et l'amplification fondée sur la séquence de l'acide nucléique (NASBA, pour nucleic acid sequence based amplification, d'Organon) [34]. Ces techniques utilisent deux enzymes à température constante. Les amplicons sont des ARN simples brins.

### **II-3-2 Amplification du signal**

L'ARN du VHC est hybridé à une sonde d'ARN spécifique qui subit une importante amplification enzymatique, et le signal de sortie correspond à la quantité d'ARN cible du VHC présente dans l'échantillon. Comme exemple de ce type de technique d'analyse l'ADN à chaîne ramifiée ou bDNA pour branched chain DNA-(test Quantiplex VHC RNA 2.0, de Bayer, et la nouvelle version 3.0)

La détection des amplicons synthétisés par PCR ou TMA est habituellement fondée sur l'hybridation spécifique du produit d'amplification par des sondes oligonucléotidiques immobilisées sur un support solide. Les complexes amplicons-sondes sont révélés grâce à une réaction enzymatique, suivie d'une détection du signal par spectrophotométrie ou luminométrie.

La quantification est fondée sur l'amplification compétitive d'une séquence témoin ajoutée à chaque échantillon en quantité connue. Les quantités relatives d'amplicons de génome viral et de témoin sont mesurées à la fin de la réaction et les résultats sont établis à l'aide d'une courbe d'étalonnage établie en parallèle au cours de la réaction.

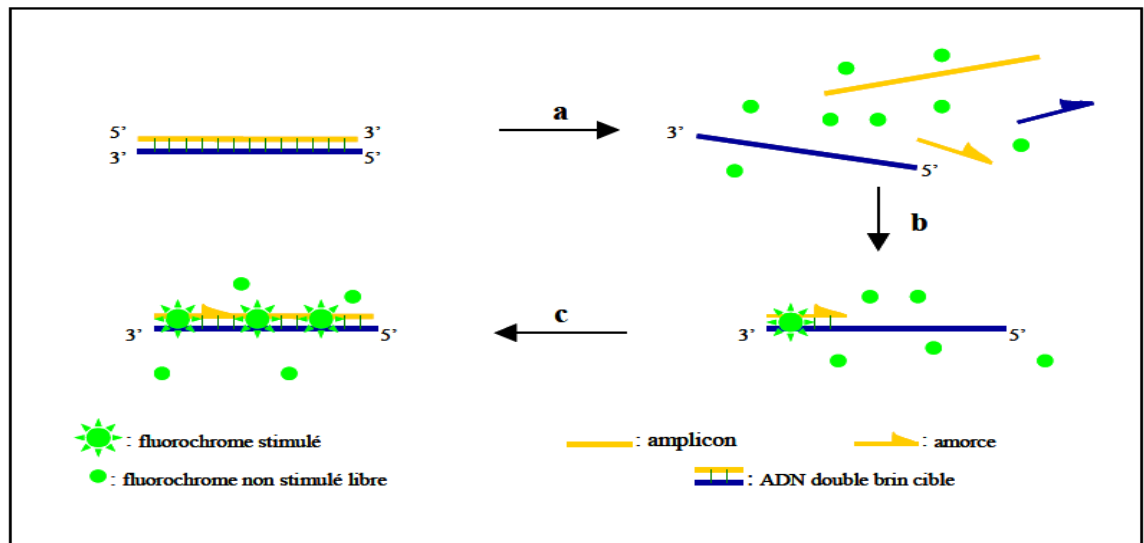
L'intérêt se tourne actuellement vers les techniques de PCR « en temps réel », dont le principe est de détecter la synthèse des amplicons afin de mesurer la quantité initiale de génome viral présente dans l'échantillon au cours de la réaction.

## **II-4 Technologies de détection**

Tous les systèmes de PCR en temps réel reposent sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification et l'augmentation du signal d'émission fluorescente est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits durant la réaction. Il existe deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons, en premier, les agents se liant à l'ADN double brin comme SYBR Green I et en deuxième les sondes fluorescentes.

### **II-4-1 Agents se liant à l'ADN double brin (Double-stranded DNA binding dyes: Lightcycler assay)**

Les molécules qui se lient à l'ADN double brin peuvent être divisées en deux classes: les agents intercalant comme le bromure d'éthidium, le YO-PRO-1, le SYBR Green I et les agents se fixant au sillon mineur (minor groove binders) comme le Hoeschst 33258. Leur émission fluorescente augmente lorsque qu'ils sont liés à l'ADN double brin [35-38]. Lors de la réaction d'amplification par PCR, le colorant libre en solution exhibe peu de fluorescence. Durant l'étape d'élongation, une augmentation de la fluorescence est associée à la quantité de colorant se fixant à l'ADN double brin naissant. Lorsque suivi en temps réel, l'augmentation du signal de fluorescence est observée pendant l'étape de polymérisation et l'émission fluorescente décroît complètement lorsque l'ADN est dénaturé à l'étape suivante. Conséquemment, l'émission de fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation pour chacun des cycles par un système de lecture intégré à l'appareil de PCR en temps réel qui permet de suivre l'augmentation de la quantité d'ADN amplifié durant la réaction (figure 11).



**Figure 7:** Agents se liant à l'ADN double brin

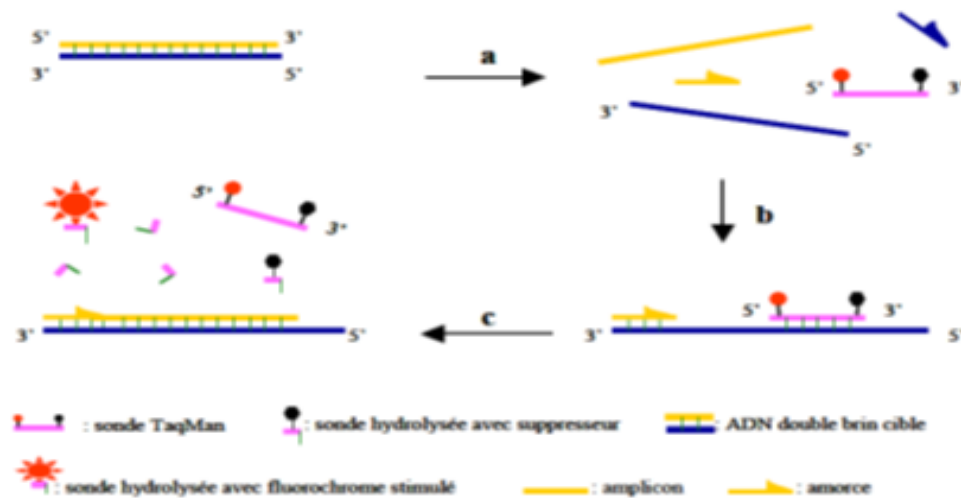
(Double-stranded DNA binding dyes: Lightcycler assay). (a) Durant la dénaturation, le SYBR Green I libre exhibe peu de fluorescence. (b) À la température d'appariement, quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant résultant en une émission de fluorescence lors de l'excitation. (c) Durant la phase de polymérisation, de plus en plus de molécules se lient au brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut-être suivi en temps réel.

#### II-4-2 Hydrolyse de sondes (Hydrolysis probes: Taqman assay)

La technologie Taqman est basée sur l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase pour hydrolyser une sonde hybridée à sa séquence cible sur l'amplicon durant l'étape d'hybridation/extension de la PCR. Un fluorochrome émetteur (reporter) (ex. FAM : 6-carboxyfluorocène) est fixé à l'extrémité 5' de la sonde d'hybridation et son émission est inhibée par un second fluorochrome suppresseur (quencher) présent à l'extrémité 3' (comme TAMRA : 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine).

Lorsque c'est stimulé, le fluorochrome émetteur transfère son énergie au fluorochrome suppresseur voisin par le principe FRET (fluorescence resonance energy transfer) qui dissipe cette énergie sous forme de chaleur plutôt que d'émettre de la fluorescence [39]. Étant donné que l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase est spécifique à l'ADN double brin, les sondes libres en solution demeurent intactes et aucune

fluorescence n'est émise. Lors de l'étape d'hybridation, la sonde et les amorces se fixent à leurs séquences complémentaires respectives. A l'étape suivante, la Taq polymérase débute l'élongation du nouveau brin d'ADN à partir de l'amorce jusqu'à ce qu'elle rencontre sur son passage la sonde hybridée qu'elle déplace et hydrolyse avec son activité 5'-exonucléasique. Le reporter est alors libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de fluorescence qui augmente à chaque cycle proportionnellement au taux d'hydrolyse de la sonde (figure 12)



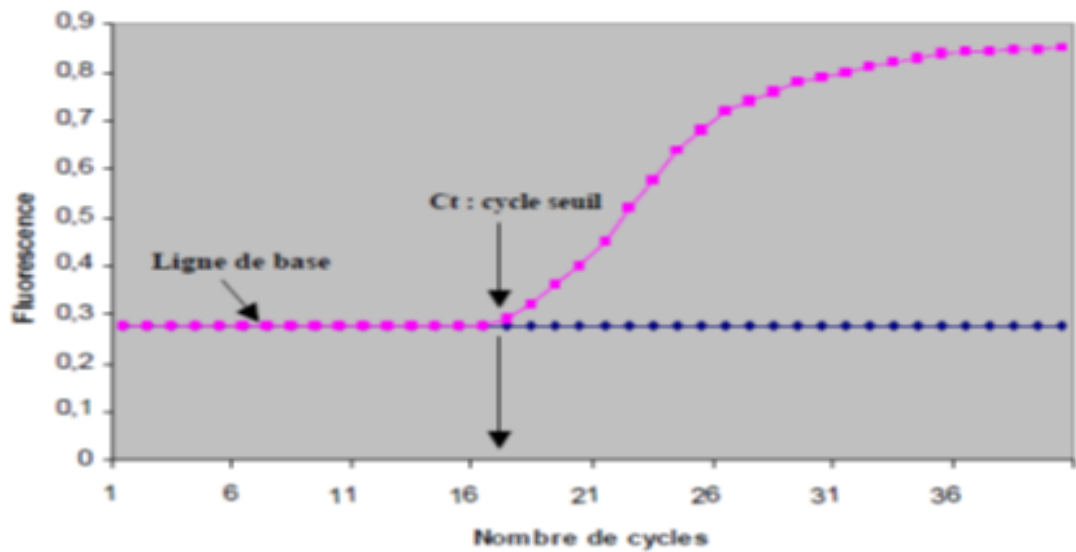
**Figure 8 : Hydrolyse de sondes**

(Hydrolysis probes: Taqman assay) (a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution. (b) À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute. (c) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de la fluorescence.

## II-5 Cycle seuil (Threshold cycle)

Le concept du « cycle seuil » est à la base d'une quantification précise et reproductible pour les techniques fluorescentes en PCR. Les valeurs de fluorescence sont enregistrées au cours de chaque cycle et représentent la quantité d'amplicons produits en un point précis dans la réaction (figure 13). Plus il y a de matrices (template) à amplifier au départ de la réaction PCR, moins élevé sera le nombre de cycle requis pour atteindre un point où le signal d'émission de fluorescence sera statistiquement et

significativement plus élevé que le bruit de fond [40]. Ce point est défini comme étant le cycle seuil (Ct) et apparaîtra toujours au cours de la phase exponentielle d'amplification. Par conséquent, la quantification n'est pas affectée par l'épuisement d'un des réactifs comme lors de la phase plateau ce qui explique pourquoi le système en temps réel est si reproductible. La valeur du Ct peut être traduite en un résultat quantitatif en la comparant avec les valeurs du Ct générées avec des matrices de quantification connues [41].



**Figure 9 :** Modèle graphique de la PCR en temps réel  
(Ct : cycle seuil)

## **DEUXIEME PARTIE : METHODES ET RESULTATS**

## DEUXIEME PARTIE : METHODES ET RESULTATS

### I-METHODES

#### I-1 Cadre de l'étude

L'étude a été effectuée au sein du service de Laboratoire National de Référence du Ministère de la Santé Publique s'occupant des enquêtes nationales pour IST/SIDA aux seins des militaires, des professionnels de sexe, des femmes enceintes et des usagers de drogues injectables.



**Figure 10 :** Institut d'hygiène à Analakely, Antananarivo

**Source :** Service de Laboratoire Nationale de Référence

**I-2 Type et période d'étude**

Il s'agit d'une étude rétrospective, descriptive portant sur une période allant du 17 janvier 2012 au 27 février 2012

**I-3 Population d'étude**

Tous les dossiers des usagers de drogues injectables à Madagascar ayant des résultats biologiques d'hépatite virale C durant la période d'étude. Les usagers de drogues injectables étaient les consommateurs de drogues par voie intraveineuse.

**I-4 Critères d'inclusion**

Ont été inclus :

- Les dossiers individuels des participants chez les usagers de drogues injectables pendant la période d'étude
- Tous les dossiers présentant des résultats de l'ELISA et de la PCR pour le dépistage de l'hépatite virale C

**I-5 Critères de non inclusion**

Ont été non inclus :

- Les dossiers ne présentant pas de résultats de l'ELISA et de la PCR pour le dépistage de l'hépatite virale C

**I-6 Critères de positivité**

A été considéré comme positif, atteinte d'hépatite virale C tout dossier montrant un résultat ELISA HVC positif et/ou charge virale HVC positif



### **I-7 Mode et taille d'échantillonnage**

- Mode d'échantillon : c'est une étude exhaustive des dossiers des participants des usagers de drogues injectables ayant fait des examens biologiques pour l'hépatite virale C durant la période d'étude
- Taille d'échantillon est représentée par les nombres de dossier : pour l'hépatite virale C, la taille d'échantillon était de 526

### **I-8 Variables étudiées**

Pour cette étude, nous avons étudié les variables dépendantes et les variables indépendantes.

#### **I-8-1 Les variables dépendantes**

- Résultat biologique de l'hépatite virale C chez les UDI selon la technique ELISA
- Résultat biologique de l'hépatite virale C chez les UDI selon la technique PCR

#### **I-8-2 Les variables indépendantes**

- Région de Madagascar
- Densité optique de l'ELISA
- Charge virale de la PCR

### **I-9 Limites de l'étude**

Notre étude reste limité du fait du :

- Caractère rétrospectif de l'étude
- Non accès aux fiches individuels des données comportementales
- Non réalisation du dosage des transaminases hépatiques
- Non détermination de la PCR chez tous les UDI
- Non réalisation du génotypage lors de la technique par PCR

### **I-10 Considérations éthiques**

- C'est une étude qui a eu l'aval du comité d'éthique du Ministère de la Santé Publique
- Un consentement éclairé a été faite avant l'enquête individuelle des UDI et avant la réalisation des examens biologiques avec respect de l'anonymat. Ceci est fondé sur une information complète, exacte et transmise de façon appropriée et précise.
- Nous sommes tenus de communiquer les résultats du dépistage aux patients et veiller au respect total du droit des patients et à la confidentialité des résultats obtenus.

### **I-11 Méthodologie**

Nous avons dépouillé les archives informatisées des résultats d'enquête nationale des usagers de drogues injectables du SLNR ou service de laboratoire national de référence. Nous avons fait une saisie manuelle à l'ordinateur en utilisant le logiciel Epi info version 2013. Les régions ont été exploitées à partir du code anonyme de région, « A » pour la région d'Analamanga, « V » pour la région d'Antsinanana et « D » pour la région de Sava.

### **I-12 Techniques utilisées**

#### **I-12-1 ELISA**

Au cours de cette étude, la technique ELISA de troisième génération a été utilisée.

##### **I-12-1-1 Appareil utilisé**

- Laveur automatique
- Automate : ASYS Expert Plus (annexe 1)

### **I-12-1-2 Réactifs et consommables**

Le kit Anti HCV ELISA 3th Gen Fortress Diagnostics Limited ® (United Kingdom) a été utilisé (annexe 2), lot 1 109 046 et date d'expiration du réactif le 20 janvier 2013.

### **I-12-1-3 Procédure du test ELISA**

Il y a 12 étapes pour la réalisation de ce test ELISA (annexe 3)

### **I-12-1-4 Interprétation des résultats et contrôle qualité**

#### **Calcul du seuil de positivité**

Seuil de positivité =  $*Nc + 0,12$

\*Nc = valeur moyenne de l'absorbance pour les 3 contrôles négatifs

Si un des contrôles négatifs n'entre pas dans la valeur du contrôle qualité, il ne devrait pas être utilisé et la valeur moyenne disponible calculé à nouveau en utilisant les deux valeurs restantes. Si plus d'une valeur DO du contrôle négatif ne répond pas aux spécifications de la gamme de contrôle de la qualité, le test est invalide et doit être répéter.

#### **Interprétation des résultats**

S = densité optique (DO) du patient à tester

**-Résultat négatif ( $S/C.O. < 1$ ) :** les échantillons donnant une absorbance inférieure à la valeur du seuil de positivité sont négatifs pour ce dosage, ceci indique qu'aucun Ac anti-VHC n'a été détecté.

**-Résultat positif ( $S/C.O. \geq 1$ ) :** les échantillons donnant une absorbance supérieure ou égale à la valeur du seuil de positivité sont considérés comme réactives, ceci indique que des Ac anti-VHC ont été détectés et il est recommandé de répéter le test dans ce cas.

-**Intermédiaire** : les échantillons donnant une absorbance  $DO \leq \text{seuil de positivité} \times 2$  sont considérés comme intermédiaire et dans ce cas, il est aussi recommandé de répéter le test.

### **I-12-2 PCR**

Au cours de cette étude, la technique PCR quantitative ou PCR en temps réel a été utilisé.

#### **I-12-2-1 Appareil utilisé**

- Automate COBAS Ampliprep (annexe 4)
- Automate COBAS Taqman 48 (annexe 5)

#### **I-12-2-2 Equipements et consommables**

- Agitateurs vortex
- Centrifugeuse de paillasse
- Portoir tubes
- Tubes aliquotes vissés 1,8ml ou 2ml
- Pipette réglable 100-1000ul
- Embouts filtrés stériles 100-1000ul
- Gants stériles non poudrés
- Essuie-tout non dégradé à l'eau (ou type Kimtech), eau distillée, alcool 70°
- S-Tubes
- SPU
- K tips
- K tubes
- Portoirs des réactifs
- K carrier, K camer portoir, K camer releaser
- Alèse

### **I-12-2-3 Procédure de la PCR**

Elle se déroule par plusieurs étapes (annexe 6)

- Sélection de la cible
- Préparation de l'échantillon
- Transcription inverse et amplification par PCR
- Amplification de la cible
- Amplification sélective
- Détection de produits de PCR dans le test Cobas Taqman

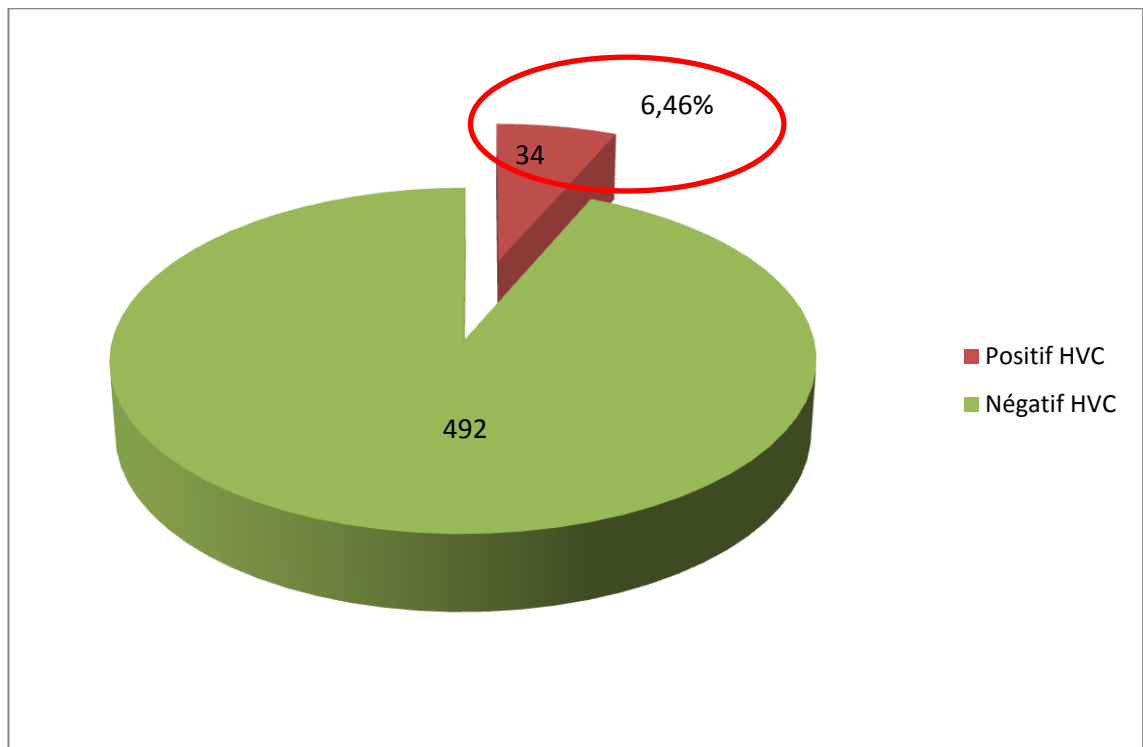
### **II-12-2-4 Lecture des résultats**

Tous les résultats étaient calculés et sortis automatiquement par le logiciel Amplilink dans la fenêtre résultats. Les résultats sont imprimés directement du logiciel Amplilink.

## II- RESULTATS

### II-1 Séroprévalence de l'infection par VHC chez les UDI

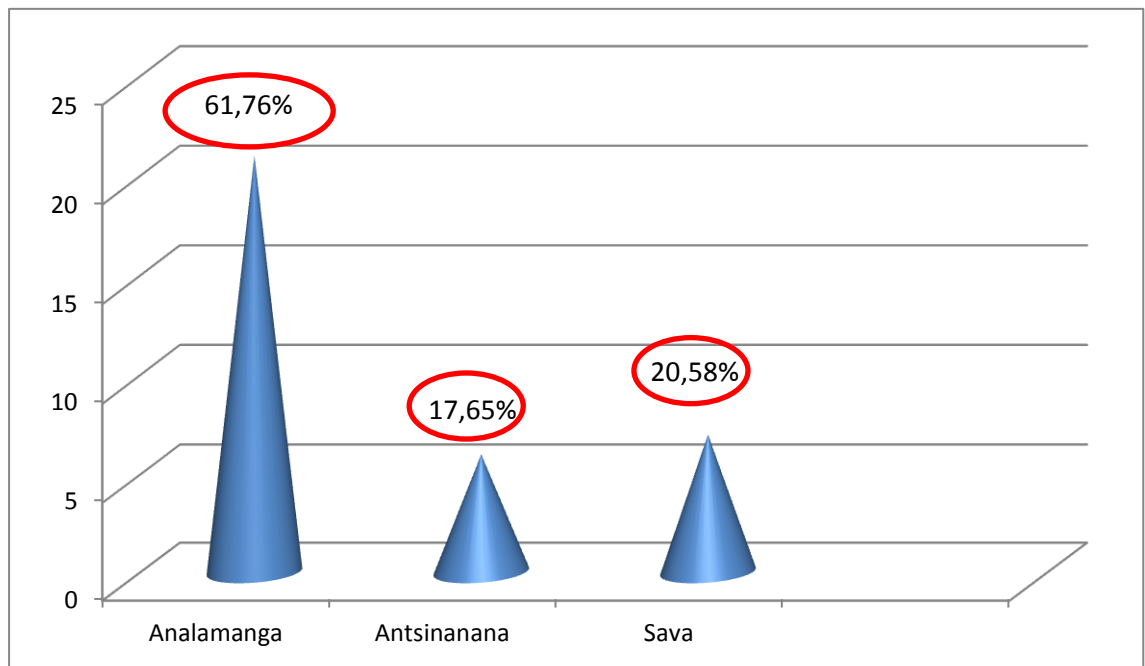
Au cours de la période d'étude, 526 UDI ont bénéficié d'un examen de dépistage d'infection par VHC par la technique ELISA dont 34 se sont révélés positifs ce qui représentait 6,46%.



**Figure 11** : Séroprévalence de l'VHC chez les UDI au SLNR en 2012 (n=526)

## II-2 Répartition de l'hépatite virale C selon la région

Au cours de la période d'étude, les UDI dans 3 régions ont bénéficié de ces examens biologiques. Pour les 34 cas positifs par la technique ELISA, 21 cas viennent de la région d'Analamanga soit 61,76%, 6 cas viennent de la région d'Antsinanana soit 17,65% et 7 cas viennent de la région de Sava soit 20,59%.

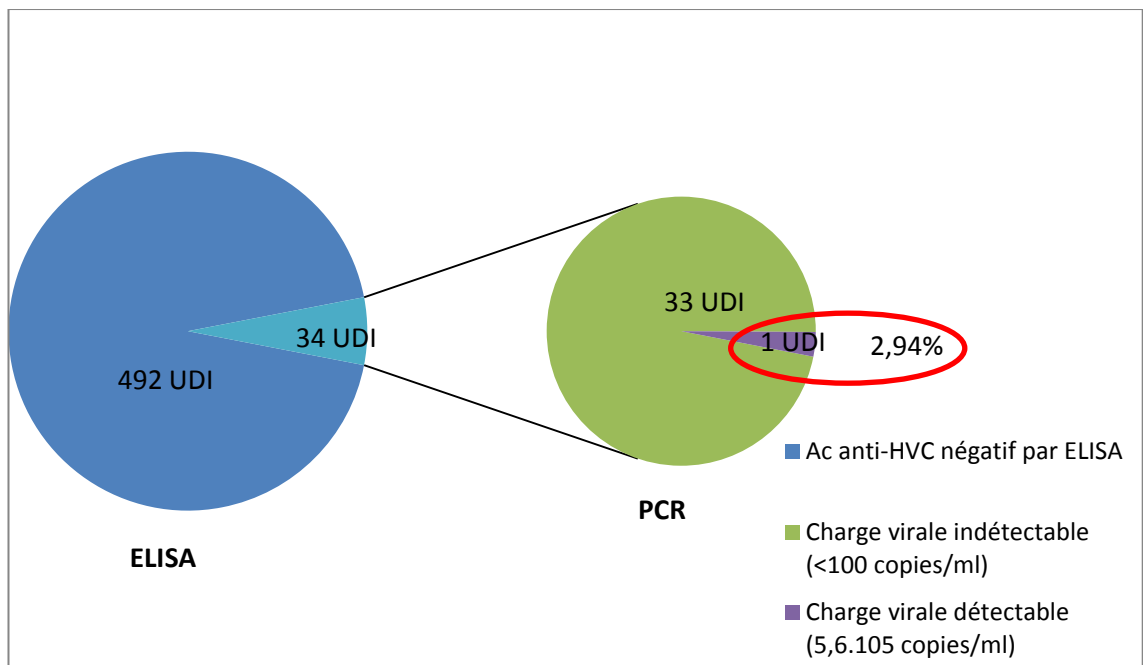


**Figure 12 :** Répartition de l'infection par VHC chez les UDI au SLNR en 2012 selon la région (n=34)



### II-3 Répartition de l'HVC chez les UDI selon la charge virale de la PCR

Dans notre étude, le nombre des UDI était de 526. Mais, seulement les 34 UDI positifs par la technique ELISA bénéficiaient d'une quantification de l'ARN viral par la PCR quantitative. Quant à leur charge virale, les 33 UDI avaient une charge virale indétectable, c'est-à-dire inférieure à 100 copies/ml et que seul un UDI avait une charge virale détectable et élevée à  $5,6.10^5$  copies/ml soit 2,94% des échantillons testés.

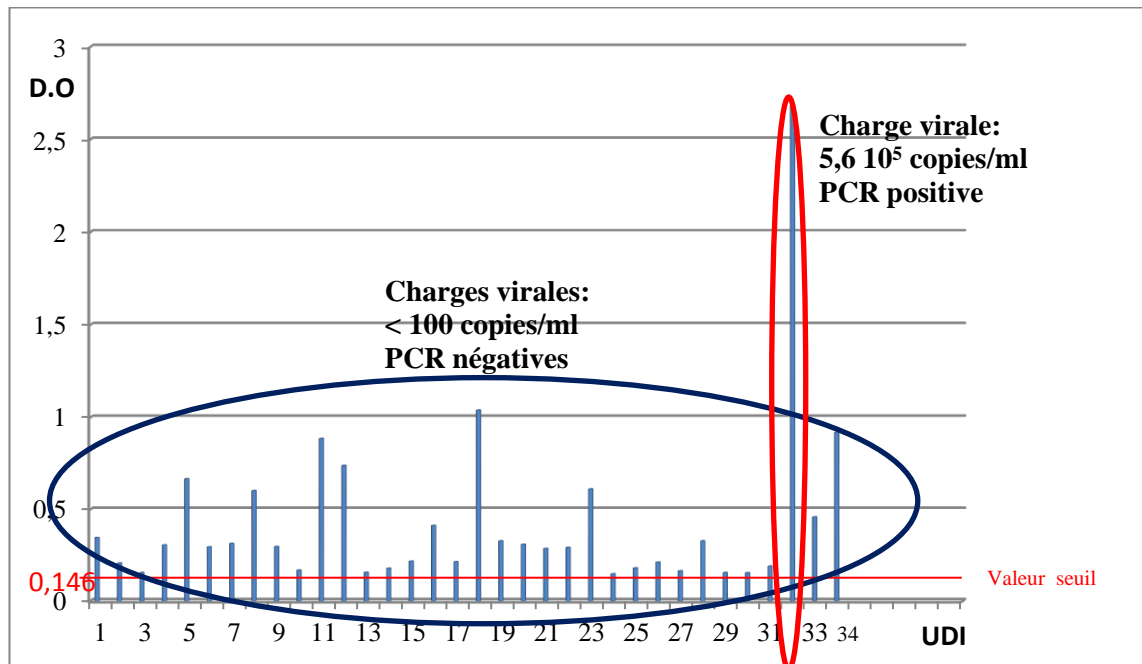


**Figure 13** : Répartition de l'infection par VHC chez les UDI au SLNR en 2012 selon la charge virale (n=34)

#### II-4 Répartition de l'hépatite virale C selon la densité optique de l'ELISA et selon la charge virale

Pour les 526 UDI, 34 était positif pour la technique ELISA. Pour ces 34 UDI positifs à l'ELISA, 33 UDI avait une densité optique inférieure à 1 et que 1 UDI présentait une densité optique à 2,681.

Pour la mesure de la charge virale, les 33 UDI avec une densité optique généralement inférieure à 1 avaient tous une charge virale inférieure à 100 copies/ml dont une PCR négative et que le seul cas avec une densité optique élevée présentait une charge élevée à  $5,6 \cdot 10^5$  copies/ml dont une PCR positive.



**Figure 14 :** Répartition de l'infection par VHC chez les UDI au SLNR en 2012 selon la densité optique de l'ELISA et selon la charge virale (n=34)

## **TROISIEME PARTIE : DISCUSSION**

## **TROISIEME PARTIE : DISCUSSION**

### **I- PREVALENCE GLOBALE DE L'HEPATITE VIRALE C**

L'infection par le VHC est un problème bien plus préoccupant dans les pays les moins avancés que dans les pays occidentaux. L'OMS a estimé qu'en 1999, 170 millions de personnes (2,9 %) vivaient avec une infection à VHC, la prévalence variant de 0,4 % en Océanie à 5,3 % en Afrique. L'Europe et l'Amérique du Nord compteraient environ 22 millions de sujets séropositifs pour le VHC contre 147 millions pour le reste du monde, dont 31,9 millions en Afrique. Ces prévalences globales cachent cependant des disparités [42].

En Asie, dans une même région caractérisée par une prévalence élevée, on peut constater une variabilité importante, 0,6 % au Népal, 5,6 % en Thaïlande, 6,1 % au Vietnam, 3,6 % aux Philippines, 2,1 % en Indonésie, 0,6 % en Papouasie [42].

En Amérique latine, zone de prévalence modérée, on observe des extrêmes allant de 0,1 % au Honduras à 11,2 % au Pérou, le Brésil et le Mexique ayant une prévalence de 2,7 et 0,7 %, respectivement [42].

Dans la région Méditerranée orientale, la prévalence du VHC est variable, elle se situe entre 1 et 2,5% dans la plupart des pays, avec les prévalences les plus élevées en Egypte >10%, en Jamahiriya arabe libyenne, au Soudan et au Yémen de 2,5% à 10%. [43].

Pour l'Afrique sub-saharienne, les auteurs estiment la prévalence de l'infection chronique par le VHC à 3 % pour l'ensemble de la population générale d'Afrique sub-saharienne. Si, dans la population générale, les taux de prévalence par pays varient beaucoup, de 0,1 % en Afrique du Sud à 13,8 % au Cameroun avec une prévalence moyenne de 6 % allant de 1,7% à 13,8 % et la majorité des pays avec une prévalence supérieur à 3 %, l'Afrique centrale est la plus touchée suivie de l'Afrique de l'Ouest (prévalence moyenne 2,4 %, extrêmes 1,1-5,5 % et un quart des pays avec une

prévalence supérieur à 3 %) et de l'Afrique australe et de l'Est (prévalence moyenne 1,6 %, extrêmes 0,1-3,2 % et 8 % et un seul pays sur 13 avec une prévalence supérieur à 3 %). Contrairement, ceux de l'Afrique du Nord sont caractérisés par une prévalence qui est de faible à modérée : 0,2 % en Algérie, 1,1 % au Maroc et 0,7 % en Tunisie [44]

En Europe, il existe un gradient nord-sud de la prévalence des anticorps anti-VHC allant de 0,5 % dans les pays du Nord, à près de 2 % dans les pays du pourtour méditerranéen. La France se situe à des taux intermédiaires. La prévalence de l'infection virale C en France a été estimée à 1,1 % en 1994, dont l'usage de drogue par voie intraveineuse était à l'origine de 29% des contaminations par le VHC dans la tranche d'âge de 20 à 59 ans. Cette prévalence est évaluée en 2003-2004 à 0,89 % [45, 46].

Aux Etats Unis, on estime que 3,9 millions de personnes, 1,8% de la population testé positif aux anticorps anti-VHC et 2,7 millions (69,2%) ont une infection chronique. La plupart (65%) des personnes anti-VHC étaient de 30 à 49 ans et avaient été infectés depuis moins de 20 ans [47].

A Madagascar, la situation de l'hépatite C était peu documenté, la séroprévalence globale de l'infection VHC en population générale était donc de 1,2%, avec 0,6% pour le sexe féminin et 1,9% pour le sexe masculin avec tendance à l'augmentation chez les sujets plus âgés. C'est une prévalence modérée, elle est semblable aux prévalences retrouvées dans les pays de l'Amérique latine, aux pays de l'Europe du Sud et aux Etats Unis. Elle est faible par rapport aux pays de l'Asie et à celles des autres pays africains avec une prévalence élevée, par contre, elle est élevée par rapport celle des pays de l'Europe du Nord avec une prévalence aux VHC faible. La prévalence actuelle de l'infection par le VHC est encore non documentée et une étude prospective sur la population générale mérite d'être adoptée. Par contre, la prévalence de l'hépatite virale C chez les donneurs de sang à Tananarive en 2009 est de 0,65% et de 0,27% en 2014 [48-50].

## **II- PREVALENCE DE L'HEPATITE VIRALE C CHEZ LES USAGERS DE DROGUES INJECTABLES**

Dans les pays de l'Europe occidentale, les taux d'anticorps anti-VHC chez les UDI se situait entre 37 et 98%. Aucune relation n'a été trouvée entre les taux de prévalence et de l'âge moyen, la durée d'utilisation de drogues par voie intraveineuse, la zone géographique, le cadre de l'étude, la méthode de recrutement ou de l'année de collecte d'échantillons [51].

En Australie, la prévalence de l'HVC est de l'ordre de 60-70% dans les populations d'UDI australiens depuis au moins 1971. La prévalence globale de l'infection était de 45% et la durée et le type d'utilisation de la drogue et de l'histoire de partage de seringues étaient similaires entre les testeurs simples et répétitifs. Le risque d'infection nouvellement acquise par le virus de l'hépatite C était plus élevé chez les clients âgés de moins de 20 ans et ceux ayant des antécédents d'emprisonnement [52-54].

A Chicago (Etats Unis), la séroprévalence du VHC chez les usagers de drogues injectables était de 76,9% et de 64,7% parmi ceux qui avaient injecté pendant 1 an ou moins en 1996 passant à 27% en 2001. Le risque relatif ajusté de séroconversion, contrôle de variables démographiques et de consommation de drogue, était le plus élevé pour le partage "cuisseurs", suivie par le partage des filtres de coton. Risques associés au partage seringue et le partage de l'eau de rinçage étaient élevée mais non significative. Après ajustement pour le partage de seringue, de partage cuisseurs sont restés le plus puissant prédicteur de séroconversion. Le partage de matériel d'injection autre que les seringues peut être donc une cause importante de transmission du VHC entre les UDI. [55, 56].

A Amsterdam (Pays-Bas), en 1990, la séroprévalence du VHC chez les usagers de drogues injectables était de 74% contre 10% chez les usagers de drogues non injectables. Les facteurs de risque indépendamment associés à la séropositivité anti-VHC étaient les antécédents et la durée de l'usage de drogues par voie intraveineuse et la fréquence des injections [57].

En Chine, en 2004, la séroprévalence du VHC au départ était de 72%. Les facteurs importants associés à cette séroprévalence élevée comprenaient l'âge > 25 ans et l'injection de drogues pendant > 2 ans [58].

En France, en 1991 à Lille a montré une incidence annuelle de la contamination par le VHC était de l'ordre de 50% lors de la première année et 90% après trois années d'usage de drogue par voie intraveineuse. En 2002, en Alsace, la prévalence du VHC parmi les usagers de drogues injectables de moins de 30 ans était de 44%, 29% en 2004 et seulement 7% en 2007. Cette réduction de la prévalence est due à une diffusion des politiques de réduction des risques, un moindre recours à la voie veineuse, une diminution de la force de l'infection et une accessibilité accrue des usagers de drogues au traitement de l'hépatite C [59].

A Madagascar, au cours de cette étude, la séroprévalence de l'infection à VHC chez les UDI est de 6,46%. La prévalence de l'infection à VHC chez les usagers de drogues injectables dans les trois villes d'enquête est élevée par rapport à la moyenne nationale chez la population générale, ceci conforte le caractère concentré de l'épidémie à Madagascar. Mais cette prévalence est faible par rapport aux prévalences des autres pays européens, en Australie, à Chicago, au Pays Bas, en Chine. Cette prévalence se concorde à la prévalence de l'infection à VHC en France après des années de diffusion de politique de réduction de risque et à une accessibilité au traitement. Ceci serait dû à une prévalence faible de l'infection à VHC dans la population générale malgache.

### **III- REPARTITION DE L'HEPATITE VIRALE C CHEZ LES USAGERS DE DROGUES INJECTABLES SELON LA REGION**

Au cours de la période d'étude, les UDI dans 3 régions de Madagascar ont bénéficié des examens biologiques. Le nombre total des UDI était de 526 dont 212 venait de la région d'Analamanga, 161 venait de la région d'Antsinanana et 153 venait de la région de Sava.

Pour la région d'Analamanga, parmi les 212 UDI, 21 était positif pour l'HVC soit une prévalence de 9,90%. Pour la région d'Antsinanana, parmi les 161 UDI, 6 était positif pour l'HVC soit une prévalence de 3,73%. Pour la région de Sava, parmi les 153 UDI, 7 également était positif pour l'HVC soit une prévalence de 4,57%

A Madagascar, la contribution du secteur tourisme au niveau économique et social est conséquente, arrive en deuxième rang après la pêche crevette. Le développement du tourisme s'est accompagné d'un développement du travail de sexe et de la recherche de l'argent facile pour les jeunes.

Dans les 3 régions, on peut retrouver ces travailleurs de sexe surtout dans les villes, la région d'Analamanga vu que c'est la capitale du Pays, la région d'Antsinanana qui est une région portuaire de pêche et de commerce et Diégo qui est une grande ville réputée dans le secteur du tourisme [60]. L'infection par l'hépatite virale C peut se transmettre par les rapports sexuels, elle se transmet surtout lors des rapports sexuels pendant les règles ou lors des rapports sexuels traumatiques surtout chez les homosexuels de sexe masculin[15, 16]. Si dans la population générale, la prévalence de l'hépatite virale C augmente, il pourrait que la prévalence de cette infection pourrait augmenter aussi chez les UDI.

Les traditions et culture malgache peuvent majorer la prévalence de l'hépatite virale C. La diversité de certaines coutumes dont certaines constituent des facteurs de vulnérabilité pour la transmission de l'hépatite virale C. Des cérémonies traditionnelles offrent des occasions de liberté sexuelle. D'autres pratiques telles que l'alliance de sang ou fati-dra pourraient favoriser la transmission de l'hépatite virale C.



Une étude prospective, plus élargie est nécessaire pour affirmer les différents facteurs influant les résultats de l'HVC chez les UDI dans chaque région de Madagascar.

#### **IV- REPARTITION DE L'HEPATITE VIRALE C CHEZ LES USAGERS DE DROGUES INJECTABLES SELON LA CHARGE VIRALE DE LA PCR**

Dans notre étude, le nombre des UDI était de 526. Mais, seulement les 34 UDI positifs par la technique ELISA bénéficiaient d'une quantification de l'ARN viral par la PCR quantitative. Quant à leur charge virale, les 33 UDI avaient une charge virale indétectable, c'est-à-dire inférieure à 100 copies/ml et que seul un UDI avait une charge virale détectable et élevée à  $5,6.10^5$  copies/ml soit 2,94%.

La technique PCR permet de faire le diagnostic d'une infection active par VHC, c'est le témoin d'une réplication active du VHC dans le foie. Il est alors de 2,94%, le pourcentage des UDI qui présentent une infection active par le VHC au cours de cette étude [61, 62].

La détection d'une infection active par la technique PCR constitue l'indication d'une décision au traitement de l'HVC par un traitement antiviral. Seuls les malades ayant cette réplication virale doivent être traités.

Dans notre étude, 34 UDI a été positif par la technique ELISA et 1 UDI par la technique PCR. Donc, on peut conclure que 1 UDI présente une infection active par le VHC et que 33 UDI sont des infections par VHC guéries.

Un seul UDI parmi les 34 positif par ELISA nécessite alors un traitement antiviral. L'indication thérapeutique n'a pas sa place chez les 33 UDI positifs par la technique ELISA.

La décision de traiter ne dépend pas des transaminases sériques élevées ou normales de façon répétée ni sur le fait que c'est une hépatite chronique avec ou sans cirrhose ni sur le fait de la présence des manifestations extrahépatiques. Elle dépend seulement par la détection d'une infection active (PCR positive).

La décision d'introduire la technique PCR dans le dépistage du VHC chez les UDI serait justifiée afin de réduire le risque résiduel sur le coût exorbitant du traitement. L'absence de diagnostic par le PCR va favoriser la surestimation des sujets traités. La réalisation de la PCR avant tout traitement serait donc toujours souhaitée [63, 64].

## **V- REPARTITION DE L'HEPATITE VIRALE C CHEZ LES USAGERS DE DROGUES INJECTABLES SELON LA DENSITE OPTIQUE ET SELON LA CHARGE VIRALE**

Les 34 UDI ayant un Ac anti-VHC par la technique ELISA ont pu bénéficier d'une détection de l'HVC par la technique PCR. Les charges virales étaient de <100 copies/ml pour les 33 UDI (PCR négatives) et de  $5,6 \cdot 10^5$  copies/ml pour 1 UDI (PCR positive).

Pour les 33 UDI avec PCR négatives, leurs densités optiques étaient généralement inférieures à 1 et pour le cas (1 cas) avec PCR positive, sa densité optique était élevée à 2,681.

Au vu du nombre restreint d'échantillon positif, aucune étude statistique significative ne peut être effectuée afin de rechercher une corrélation entre une densité optique élevée et une charge virale positive. Cependant, cette corrélation positive est corroborée par la littérature. Enfin, certains auteurs décrivaient également que pour une densité optique inférieure à 0,15, la charge virale de l'HVC est inférieure à 100 copies/ml et que pour une densité optique supérieure ou égale à 0,15, la PCR était positive [65, 66].

Pour confirmer cette corrélation entre densité optique de l'ELISA et la charge virale de la PCR, nous suggérons une étude plus élargie incluant la signification statistique de la valeur p, l'effectif chez un plus grand nombre de patient et le calcul de la valeur de ratio permettant d'éviter les faux négatifs et de minimiser les faux positifs.

La mise en évidence d'une corrélation entre le taux d'anticorps anti-VHC par la densité optique et la détection d'ARN viral implique des perspectives intéressantes. Un nouvel algorithme décisionnel simplifié peut être proposé pour le diagnostic d'infection par le VHC permettrait de diminuer le recours à la PCR de coût élevé.

## **VI- TECHNIQUES UTILISEES POUR LE DEPISTAGE DE L'HEPATITE VIRALE C**

### **VI-1 ELISA**

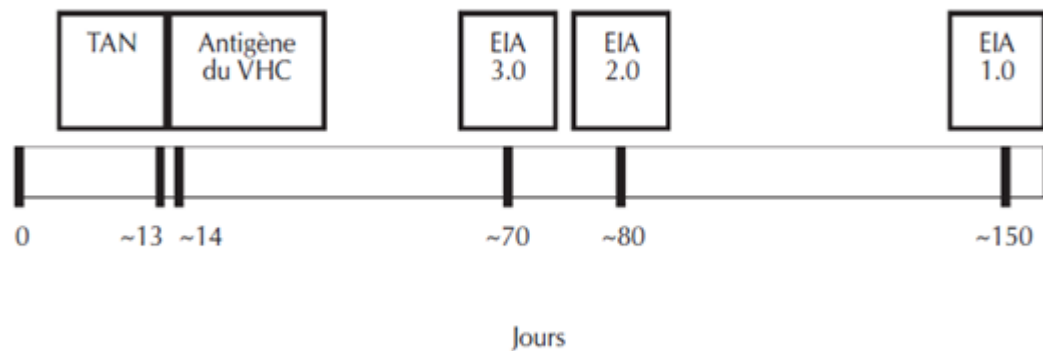
La recommandation des techniques pour le dépistage de l'Hépatite virale C varie suivant la situation socio-économique d'un pays à l'autre et les matériels disposés dans le laboratoire. Au cours de cette étude, la technique ELISA et la technique PCR ont été utilisées.

Pour la technique ELISA, dans notre étude, on a utilisé la technique ELISA de 3<sup>e</sup> génération. Cette étude est différente de l'étude menée en 1982 à 1986 sur la prévalence de l'hépatite virale C à Madagascar qui a utilisé un test ELISA de première génération et d'une étude en 1998, qui a utilisé comme technique de dépistage de l'hépatite virale C, la technique ELISA de 2<sup>e</sup> génération. D'autre étude est similaire à notre étude qui a utilisé la technique ELISA de 3<sup>e</sup> génération [66-68].

Les techniques ELISA de première génération avaient pour limite la séroconversion retardée après l'hépatite aiguë et un nombre non négligeable de faux positifs ou négatifs. Alors que les techniques ELISA de deuxième et de troisième génération sont plus sensibles, 98 % et plus spécifiques, 99 %.

Au cours de cette étude, la sensibilité et la spécificité de l'ELISA étaient respectivement de 99,5% et de 99,7%. Cette sensibilité et spécificité sont similaires à celles de certains auteurs qui retrouvaient une sensibilité et spécificité comprises entre 97 et 100% [69].

Le temps entre l'infection aiguë par le VHC et la détection de part les 3 tests ELISA est différent, ce temps est de 70 jours pour la technique ELISA de 3e génération, de 80 jours pour la technique ELISA de 2<sup>e</sup> génération et de 150 jours pour la technique ELISA de 1<sup>re</sup> génération (Figure 14). La technique ELISA de 3<sup>e</sup> génération reste alors la meilleure technique par rapports aux 2 autres techniques.



**Figure 15 :** Temps écoulé entre le moment d'une infection aiguë par le VHC et sa détection par divers tests analytiques

**Source :** Krajden M. Diagnostic et test du virus de l'hépatite C. Revue canadienne de santé publique. Septembre 2000;91(1) ; 36-42

Cependant, la sensibilité des tests ELISA dépend fortement de l'état immunitaire de la population testée. Chez des personnes immunocompétentes, la sensibilité du test ELISA est beaucoup moindre au cours d'une infection aiguë qu'au cours d'une infection chronique. Chez des individus immunodéprimés, une réponse immunitaire peut être détectable seulement plusieurs mois ou années après le moment de l'infection, ou même ne jamais se produire et qu'au cours de ces cas, la sensibilité des tests ELISA est plus faible, de l'ordre de 50 à 95 % [70] ce qui représente les limites de ces tests.

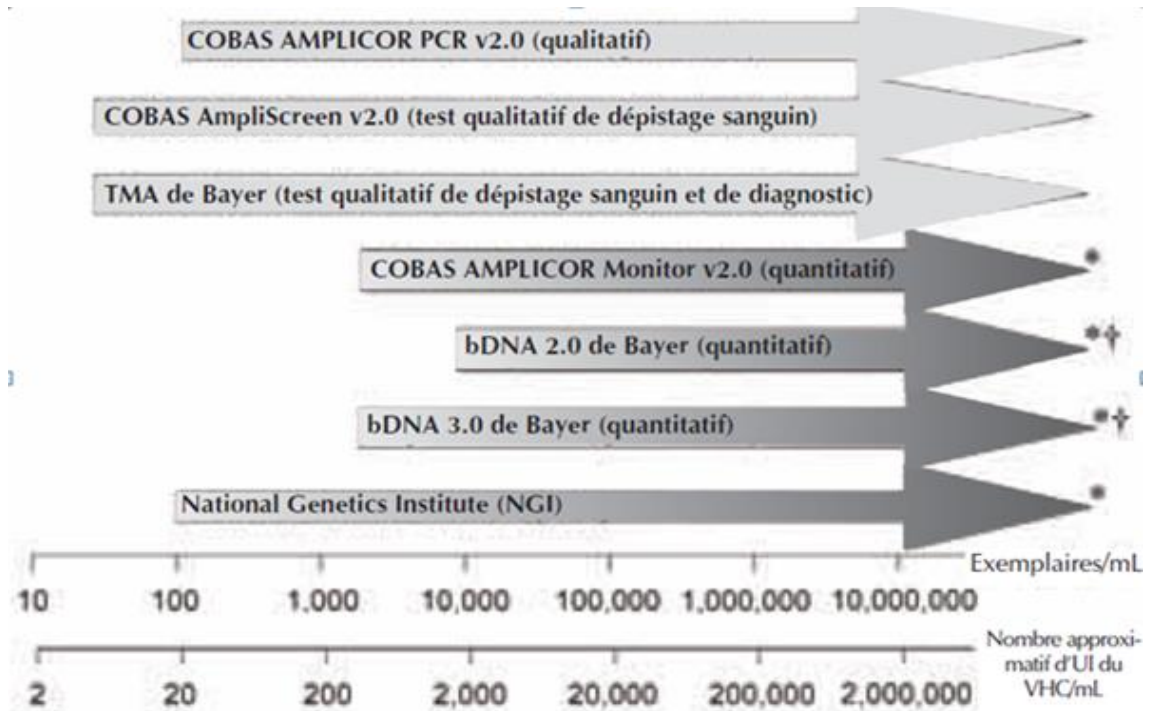
## **VI-2 PCR**

L'ARN du VHC a été recherché dans les échantillons confirmés positifs aux anticorps anti-VHC par la technique PCR (Polymerase chain reaction).

Au cours de cette présente étude, la technique PCR quantitative a été utilisée. Cette étude est similaire aux études effectuées au Burkina Faso [71] mais diffère de celle effectuée au Maroc par l'utilisation de la PCR qualitative [72].

La PCR qualitative utilise un système ouvert et constitue un risque de faux positif due à une contamination de l'échantillon ou lors de la réalisation du test. La PCR quantitative utilise un système en tubes fermés et un système fermé pour la quantification et la postamplification qui minimise ou élimine les problèmes de contamination. Le processus complet est donc automatisé du début à la fin ce qui réduit le temps d'analyse [73, 74].

Du point de vue des performances techniques, la PCR qualitative est plus sensible avec un seuil de détection de l'ordre de 100 copies de génome par ml soit environ 50 UI/ml que la PCR quantitative, avec un seuil de 600 UI/ml [75, 76]. (Figure 15)



**Figure 16 :** Fourchettes approximatifs de détection de l'ARN du VHC

**Source :** Krajden M. Diagnostic et test du virus de l'hépatite C. Revue canadienne de santé publique. Septembre 2000;91(1) ; 36-42.

La PCR qualitative est indiquée dans le diagnostic d'une infection par VHC et qu'elle est moins coûteuse que la PCR quantitative. Cette dernière est indiquée dans le cadre du traitement [77, 78].

Dans notre étude, on a utilisé les techniques ELISA pour le diagnostic de l'infection par VHC et la technique PCR quantitative pour décider le traitement.



La PCR quantitative permet de suivre la réponse au traitement. La quantification de l'ARN viral à la 4<sup>e</sup> semaine du traitement ou réponse virologique rapide est un facteur prédictif important de la guérison quel que soit le génotype du VHC. Si l'ARN du VHC est indétectable, le traitement de 24 semaines pour le génotype 2 ou 3 est réduit à 12 à 16 semaines et le traitement de 48 semaines pour le génotype 1, 4 ou 6 est réduit à 24 semaines [79-81].

Pour les UDI infectés par le génotype 1, la PCR quantitative est indiquée au début du traitement et aux 12 semaines et que la PCR qualitative est recommandée après 24 semaines de traitement.

Pour la quantification de l'ARN viral aux 12 semaines, si leur charge virale est réduite à moins de 2 Log10, ils doivent arrêter le traitement car ils n'ont pas la chance d'obtenir une guérison. Par contre, si leur charge virale est réduite à plus de 2 Log10, le traitement doit durer de 48 à 72 semaines [82, 83].

Pour la recherche de l'ARN viral par PCR qualitative après 24 semaines, si elle est positive, le traitement doit être arrêté car aucune réponse ultérieure n'est observée chez ces sujets ; si elle est négative, le traitement doit être poursuivi jusqu'aux à la 48<sup>e</sup> semaine.

Quel que soit le génotype des UDI, la réponse virologique à la fin du traitement est évaluée à la 24<sup>e</sup> ou 48<sup>e</sup> semaine selon la durée de celui-ci. Une recherche d'ARN viral positive à cette date est associée à une forte probabilité de rechute précoce après l'arrêt du traitement [84-85].

## VII- LIMITES DE L'ETUDE

Cette étude reste limitée du fait du caractère rétrospectif de l'étude, non accès au fiche individuel des données comportementales, non réalisation du dosage des transaminases hépatiques, non détermination de la PCR chez tous les UDI, non réalisation du génotypage lors de la technique par PCR.

Cette étude concernait seulement un nombre restreint d'UDI c'est-à-dire les UDI des 3 régions de Madagascar, aussi les résultats de la prévalence de l'hépatite virale C chez les UDI à Madagascar sont sous-estimés.

L'étude n'avait pas tenu compte des données comportementales des UDI vu la non accessibilité aux fiches individuels contenant ces données comportementales :

- Etat civil des UDI : âge, sexe, profession
- Utilisation de matériel d'injection
- Rapport sexuel à risque : multipartenariat
- Usage de préservatif

Au cours de cette étude, le dosage des transaminases hépatiques n'a été déterminé. Une augmentation de l'ALAT était observée dans 73,7% des patients atteint d'HVC avec une moyenne de 5,8 fois à la limite supérieure à la normale et que une augmentation de l'ASAT était observée dans 59% des cas avec une moyenne de 3,97 fois à la limite supérieure à la normale [72]. Certains auteurs, suggéra qu'une augmentation des transaminases pourrait avoir une autre cause non virale, telle que l'absorption d'alcool et de certains produits pharmaceutiques [86].

Tous les UDI n'avaient pas pu bénéficier la détermination de la charge virale par PCR lors de cette étude, seuls les 34 UDI qui étaient positifs par ELISA en bénéficier. Alors qu'une hépatite C séronégative se définit par un test ELISA négatif et une PCR positive peut être observé chez les immunodéprimés avec apparition retardée des anticorps. Seule, la technique par PCR permet de reconnaître ces hépatites C séronégatives, aucun des autres tests de dépistage n'est capable de le diagnostiquer [87].

La présente étude n'a pas déterminé le génotypage lors de la technique par PCR. Une fois l'hépatite C active diagnostiquée par PCR, La détermination du génotype doit être systématiquement réalisée avant le début du traitement antiviral. Le traitement est administré 24 semaines chez les malades infectés par un VHC de génotype 2 ou 3. Le traitement est en revanche administré 48 semaines chez les malades infectés par un VHC de génotype 1, 4, 5 et 6 [88].

## **CONCLUSION**

## CONCLUSION

Le dépistage de l'infection par VHC chez les UDI est un élément clé pour assurer la prévention, la prise en charge précoce et bien adaptée de la maladie.

Au SLNR à Antananarivo, les techniques sérologiques et la technique par PCR constituent le test de dépistage.

La présente étude est une étude rétrospective descriptive portant sur une période de 1 mois et 10 jours ayant lieu au SLNR à Antananarivo sur tous les dossiers des UDI ayant des résultats biologiques d'HVC par technique ELISA et par technique PCR.

La fréquence de l'infection par VHC chez les UDI à Madagascar est élevée de l'ordre de 6,46% par la technique ELISA dont 2,94% positifs par la technique PCR. La région d'Analamanga est la plus concernée au cours de cette étude. La valeur de la densité optique de l'ELISA est en corrélation avec le taux de la charge virale et la PCR a de nombreux intérêts dans le cadre diagnostique et thérapeutique de l'hépatite virale.

Le dépistage de l'infection par VHC seulement par la technique ELISA n'est pas suffisant. La technique PCR reste la meilleure technique pour diagnostiquer une infection active chez les UDI ainsi permet de trancher le traitement. Ces deux techniques de dépistage doivent être adoptées dans tous les régions de Madagascar permettant de réduire le réservoir de cette infection chez les UDI. Le génotypage par PCR devrait aussi être réalisé pour déterminer la durée et la posologie du traitement.

## ANNEXE 1



Automate ASYS Expert

**Source:** SLNR Analakely Antananarivo

## ANNEXE 2

Kit Anti HCV ELISA 4th Gen Fortress Diagnostics Limited ®

(United Kingdom)

<b>Kit</b>	<b>Volume</b>
Plaque à micropuits de 96 tests	1 plaque (8x12/12x8)
Contrôle négatif	1 x 0,2ml
Contrôle positif	1 x 0,2ml
Diluant d'échantillon	1 x 13ml
Réactif HRP-conjugué	1 x 13ml
Tampon de lavage	1 x 50ml
Solution chromogène A	1 x 7ml
Solution chromogène B	1 x 7ml
Solution stop	1 x 7ml
Sac plastique bien scellé	1 unité
Couvercle de la plaque	1
Encarts d'emballage	1 copie

## **ANNEXE 3**

### **Procédure du test ELISA**

Il y a 12 étapes pour la réalisation de ce test ELISA de 3<sup>e</sup> génération selon la recommandation du fabricant :

#### **1<sup>ere</sup> étape : préparation des réactifs**

D'abord, mettre les réactifs et les calibrateurs à température ambiante pendant 15 à 30 minutes. Mettre les tampons de lavage en présence de cristaux de sel, s'il y a formation de cristaux dans la solution, resolubiliser par chauffage à 37°C pour que les cristaux puissent être dissouts. Diluer à 1/20 par de l'eau distillée les tampons de lavage en utilisant seulement des récipients propres.

#### **2<sup>e</sup> étape : numérotation des puits**

Mettre seulement des numérotations pour les bandes qu'on va utiliser pour le test. La numérotation inclue 3 contrôles négatifs, 2 contrôles positifs et un blanc.

#### **3<sup>e</sup> étape : ajout de diluant**

Ajouter 100 ul de diluant d'échantillon à chaque puits à l'exception du blanc.

#### **4<sup>e</sup> étape : ajout d'échantillon**

Ajouter 10 ul de contrôle positif, de contrôle négatif et d'échantillon aux puits respectivement et changer d'embout à chaque pipetage de contrôle négatif, contrôle positif et d'échantillon pour éviter les contaminations croisées. Mélanger en tapotant doucement la plaque.

#### **5<sup>e</sup> étape : incubation**

Couvrir la plaque par le couvercle de la plaque et incuber à 37°C pendant 30 minutes.



6<sup>e</sup> étape: lavage

Après l'incubation, retirer et jeter le couvercle de la plaque. Laver 5 fois les puits avec les diluants du tampon de lavage. A chaque temps, tremper les micropuits 30 à 60 secondes et après le dernier cycle de lavage, éliminer le fluide résiduel en frappant la plaque sur du papier absorbant, le côté supérieur en bas.

7<sup>e</sup> étape: ajout de HRP conjugués

Ajouter 100ul de HRP conjugués à chaque puits à l'exception du blanc réactif.

8<sup>e</sup> étape : incubation du HRP conjugués

Couvrir la plaque par la couvre plaque et incuber à 37°C pendant 30 minutes

9<sup>e</sup> étape : lavage

A la fin de l'incubation, retirer et jeter le couvercle de la plaque. Laver chaque puits 5 fois comme dans l'étape 6

10<sup>e</sup> étape : coloration

Dispense 50ul de solution chromogène A and 50ul de solution chromogène B à chaque puits incluant le blanc et mélanger en tapotant doucement la plaque. Incuber la plaque à 37°C pendant 15 minutes évitant la lumière. La réaction enzymatique entre la solution chromogène A et B produit une coloration bleue sur le contrôle positif et aux puits d'échantillon positif anti-VHC.

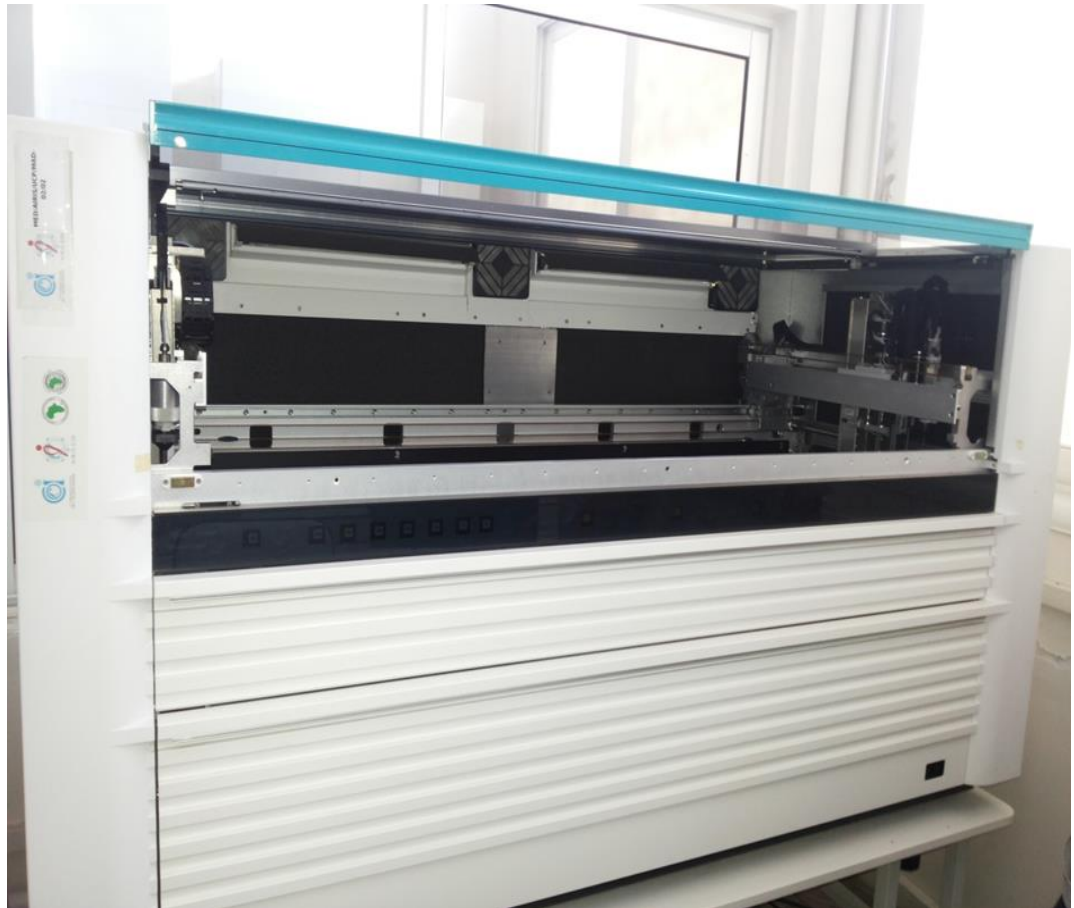
11<sup>e</sup> étape : stop réaction

Ajouter 50ul de solution stop à chaque puits et mélanger en tapotant doucement la plaque. Une coloration jaune se développe aux contrôles positifs et aux puits d'échantillon positif anti-VHC.

12<sup>e</sup> étape : mesure de l'absorbance

Calibrer la lecture de la plaque avec le puits du blanc réactif et faire la lecture de l'absorbance à 450 nm. Calculer le seuil de positivité et évaluer les résultats.

## ANNEXE 4



Automate COBAS Ampliprep

**Source:** LNR Analakely Antananarivo

## ANNEXE 5



Automate COBAS Taqman 48

**Source:** LNR Analakely Antananarivo

## ANNEXE 6

### Procédure de la PCR

La PCR se fait a plusieurs étapes :

#### **-Sélection de la cible**

Un appareil à base de silice est utilisé pour capturer l'ARN du VHC. COBAS Ampliprep/COBAS Taqman 48 utilise la transcription inverse et des amorces d'amplification qui définissent une séquence à l'intérieur de la région hautement conservée de la région 5' non traduite du génome du VHC.

#### **-Préparation de l'échantillon**

L'automate COBAS Ampliprep est utilisé pour la préparation de l'échantillon qui prend 850ul de plasma ou de sérum. Au cours de l'incubation à une température élevée, les particules virales sont lysées par une lyse chaotrope/tampon qui libère des acides nucléiques.

Une solution protéase, un nombre connu de molécules du VHC, un réactif de lyse et des particules de verre magnétiques sont introduits dans l'échantillon. Le lavage des particules de verre magnétiques enlève les substances non liées tels que les sels, les protéines cellulaires et d'autres impuretés. Les acides nucléiques sont absorbés, élués à une température élevée avec une solution aqueuse. Les échantillons transformés contenant les particules de verre magnétique ainsi que l'ARN du VHC sont ajoutés au mélange d'amplification et transférés à l'automate COBAS Taqman 48. L'ARN cible par le VHC subit ensuite une transcription inverse, amplifié et détecté simultanément par le clivage d'une cible spécifique et une sonde oligonucléotidique marquée.

#### **- Transcription inverse et amplification par PCR**

La transcription inverse et la réaction de la PCR est effectuée avec un enzyme recombinant espèces *Thermus* DNA polymérase (Z05). En présence de manganèse et dans les conditions de tampon appropriées, Z05 a deux reverse transcriptase et DNA polymérase. Ceci permet à la fois la transcription inverse et l'amplification de la PCR pour se produire en même temps que la détection en temps réel de l'amplicon.

Les échantillons traités sont ajoutés au mélange d'amplification dans des tubes d'amplification (K-tubes) dans laquelle la transcription inverse et l'amplification par PCR se produisent. Le mélange réactionnel est chauffé pour permettre une amorce en aval pour hybrider spécifiquement à l'ARN cible par le VHC.

En présence de magnésium et d'excès de deoxynucléotide triphosphate (dNTPs), incluant deoxyadenosine, deoxyguanosine, deoxycytidine et deoxyuridine triphosphates, Z05 polymérase étend les amorces hybridées formant un brin d'ADN complémentaire à l'ARN cible.

### **-Amplification de la cible**

Suite à la transcription inverse de l'ARN cible par le VHC, le thermocycleur dans l'analyseur COBAS Taqman 48 chauffe le mélange réactionnel pour dénaturer l'ARN, ADNc hybride et pour exposer les séquences cibles d'amorces spécifiques. Z05 en présence du magnésium et d'excès de dNTPs incluant deoxyadenosine, deoxyguanosine, deoxycytidine et deoxyuridine triphosphates étend les amorces hybridées le long de la matrice cible pour produire une double molécule d'ADN standard appelée amplicon. COBAS Taqman 48 répète automatiquement ce processus pour un nombre déterminé de cycle, chaque cycle pour but de doubler la quantité d'ADN amplicon et le nombre de cycle est préprogrammé dans le COBAS TaqMan 48. L'amplification ne se produit que dans les régions du génome du VHC entre les amorces, le génome du VHC n'est amplifié pas en entier.

### **-Amplification sélective**

L'amplification sélective de l'acide nucléique cible de l'échantillon est réalisé par COBAS Ampliprep/COBAS Taqman 48 par l'utilisation de l'enzyme AmpErase (uracil-N-glycosylase) et deoxyuridine triphosphate (dUTP). L'enzyme AmpErase reconnaît et catalyse la destruction des brins d'ADN contenant la désoxyuridine, mais pas d'ADN contenant désoxythymidine. Deoxyuridine n'est pas présent naturellement dans l'ADN mais il est toujours présent dans l'amplicon en raison de l'utilisation de deoxyuridine triphosphate comme une dNTPs dans le nouveau réactif Master Mix, donc seul l'amplicon contient un deoxyuridine. Ce dernier rend l'amplicon contaminant en raison de l'utilisation de la désoxyuridine triphosphate comme l'un des dNTPs dans le réactif Master Mix, catalyse le clivage de l'ADN contenant de la désoxyuridine à résidus

désoxyuridine en ouvrant la chaîne de désoxyribose à la position C1. Lorsqu'il est chauffé dans la première étape de cyclage thermique, les chaînes de cassures de l'ADN de l'amplicon dans la position de la désoxyuridine, ce qui rend l'ADN non-amplifiable. L'enzyme AmpErase reste inactif pendant une période de temps prolongée une fois exposé à des températures supérieures à 55 ° C , soit , tout au long des étapes thermiques de cyclisme , et donc ne détruit pas amplicon cible formé après la réaction PCR.

#### **- détection de produits de PCR dans le test Cobas Taqman**

Le COBAS AmpliPrep / COBAS TaqMan HCV test utilise la technologie PCR en temps réel. L'utilisation de sondes fluorescentes marquées double permet une détection en temps réel de l'accumulation du produit de PCR par la surveillance de l'intensité d'émission de colorants rapporteurs fluorescents libérés au cours du processus d'amplification. Les sondes sont constituées de VHC HC en QS- spécifique des sondes oligonucléotidiques avec un colorant rapporteur et un colorant extincteur, dans le COBAS AmpliPrep / COBAS TaqMan HCV test, les sondes HCV VHC et QS sont étiquetées avec différents colorants rapporteurs fluorescents. Lorsque ces sondes sont intacts, la fluorescence du colorant reporter est supprimée par la proximité du colorant désactivateur à cause des effets de transfert d'énergie de type Forster. Au cours de la PCR, la sonde hybridée à une séquence cible et est clivée par la 5' à 3' activité de nucléase de la polymérase thermostable Z05 ADN. Une fois que le reporter et extincteur colorants sont libérés et séparés, la trempe ne se produit plus, et l'activité de fluorescence du colorant rapporteur est augmentée. L'amplification de l'ARN du VHC et GCV QS ARN sont mesurés indépendamment à différentes longueurs d'onde

Le processus est répété pour un nombre déterminé de cycles, chaque cycle de manière efficace en augmentant l'intensité d'émission du reporter individuel, permettant l'identification indépendante de l'ARN du VHC et du VHC ARN QS. Le cycle de PCR, où une courbe de croissance exponentielle commence croissance est liée à la quantité de matière de départ au début de la PCR.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Imbert I, Dimitrova, Wolf M. Réplication du virus de l'hépatite C: système d'étude, avantages et limites. Virologie. Juillet. 2004 ; 8 ; 4.
2. OMS. Hépatite C. Aide-Mémoire N°164 ; Avril 2014.Consulté le 18 Août 2014. Disponible sur <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/fr>.
3. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. J Hepatol. 2006; 45(4):529-38.
4. Choo O, Kuo G, Weiner A, Overby L, Bradley D, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science. 1989; 244:359-62.
5. Pawlotsky JM. Le virus de l'hépatite C. Hépatite C. E.D.K Paris. 2004:1-17.
6. Pawlotsky J, Tsakiris L, Roudot-Thoraval F, Pellet C, Stuyver L, Duval J et al. Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. J Infect Dis. 1995; 171: 1607-10.
7. Scarselli E, Ansuini. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. Embo J. 2002; 21(19):5017-25.
8. Pileri P, Uematsu Y. Binding of hepatitis C virus to CD81. Science. 1998; 282(5390):938-41.
9. Liu S, Yang W et al. Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. J Virol. 2009; 83(4):2011-4.
10. Miyanari Y, Atsuzawa. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. Nat Cell Biol. 2007; 9(9):1089-97.



11. Lucidarme D, Foutrein P, Creusy C, Foizy G, Foutrein MC. Prevalence of hepatitis C, B and D markers and histopathological aspects in a group of intravenous drug addicts. *Gastroenterol Clin Biol*. 1994; 18:964-8.
12. Hagan H, Thiede H, Weiss NS, Hopkins SG, Duchin J. Sharing of drug preparation equipment as a risk factor for hepatitis C. *Am J Public Health*. 2001; 91:42-6.
13. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-hepatitis. *N Engl J Med*. 1989 ; 321:1494-500.
14. Luminet B, Guyonnet JP. Sécurité sanitaire, tatouage et piercing, des pratiques professionnelles à risques. *BEH*. 2002; 4:1517.
15. Pawlotsky JM. Nouveautés dans le diagnostic et la prise en charge des infections par le virus de l'hépatite C. *Supplément RFL*. 1999; 318: 1-4.
16. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet, Infect Dis*. 2005; 5:558–67.
17. Ohto H, Terazawa S, Sasaki N. Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. *N Engl J Med*. 1994; 330: 744-50.
18. Kumar RM, Shahul S. Role of breast-feeding in transmission of hepatitis C virus to infant of HCV-infected mothers. *J Hepatol*. 1998; 29:191-7.
19. Marcellin P. Conférence Internationale de Consensus sur l'hépatite C. *Le Concours Médical*. 2000; 122: 177-81.
20. Segondy M. Diagnostic et suivi biologique des hépatites virales. *Module de Base 3 Microbiologie*. 2005 Novembre:1-17.

21. Pik S, Mallet V, Dhalluin, Fontaine H. Hépatites Virales. EMC, Maladies Infectieuses. 2007 ; 8-10.
22. Barthet M, Beaugerie L. HGE selon les épreuves classantes nationales (ECN) abrégés connaissances et pratiques. Elsevier Masson. 2009 ; 4 :6-11.
23. Anglaret X, Mortier E. Maladies infectieuses. Estem. 2002 ; 158-63.
24. Bureau C, Peron J-M, Vinel J-P. Hépatogastro-entérologie. Paris: Masson. 2008 ; 51.
25. Berebi W. Hépatogastro-entérologie. Estem. 2006: 7-35.
26. Naito M, Hayashi N, Hagiwara H, Hiramatsu N, Kasahara A, Fusamoto H et al. Serum hepatitis C virus RNA quantity and histological features of hepatitis C virus carriers with persistently normal ALT levels. Hepatology. 1994; 19:871-5.
27. Janot C. Diagnostic biologique des hépatites virales. Le concours Médical. Novembre 2000; 122: 2692.
28. Lavanchy D, Steinmann J, Moritz A, Frei P. Evaluation of a new automated third-generation anti-HCV enzyme immunoassay. J Clin Lab Anal. 1996; 10: 269-76.
29. Hahn J-M. Checklist Médecine interne, 2ème édition. Maloine. 2003 : 395.
30. Magniez F. La technique ELISA. Biotechnologie. 2008.
31. Peccoud J. La PCR quantitative : un nouvel outil pour l'analyse médicale. J Clin Microbiol. 1993; 9:1378-85.

32. Mellor J, Hawkins A, Simmonds P. Genotype dependence of hepatitis C virus load measurement in commercially available quantitative assays. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(8):2525-32.
33. Schiff ER, de Medina M, Kahn RS. New perspectives in the diagnosis of hepatitis C. *Semin Liver Dis.* 1999; 19(1):3-15.
34. Lunel F, Cresta P, Vitour D. Comparative evaluation of hepatitis C virus RNA quantitation by branched DNA, NASBA, and monitor assays. *Hepatology.* 1999; 29(2):528-35.
35. Higuchi R, Dollinger G, Walsh P and Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology.* 1992; 10: 413-17.
36. Ishiguro T, Saitoh J, Yawata H, Yamagishi H, Iwasaki S, Mitoma, Y. Homogeneous quantitative assay of Hepatitis C virus RNA by polymerase chain reaction in the presence of a fluorescent intercalator. *Analytical Biochemistry.* 1995; 229: 207-13.
37. Morrison T, Weis J, Wittwer C. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBRgreen I monitoring during amplification. *Biotechniques.* 1998; 24:952-62.
38. Nielsen PE. Sequence-selective DNA recognition by synthetic ligands. *Bioconjugate Chemistry.* 1991; 2:1-12.
39. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real time PCR in virology. *Nucleic Acids Research.* 2002; 30: 1292-305.
40. Gibson U E, Heid C A, Williams P M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research.* 1996; 6:995-1001.
41. Bustin S A. Absolute quantification of mRNA using real time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *JME.* 2000; 25: 169-93.

42. Organisation mondiale de la Santé. Hépatite C : prévalence mondiale. Rel Epidemiol Hebd. 1999 ; 74 : 421-8.
43. Frank C. The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. Lancet. 2000; 355:887-91.
44. Prati D. Transmission of hepatitis C virus by blood transfusions and other medical procedure: a global review. J Hep. 2006; 4:607-16.
45. Dubois F, Desenclos JC, Mariotte N, Goudeau A. Hepatitis C in a French population-based survey. J Hep. 1994; 25 : 1490-6.
46. Stephane H. Estimation des taux de prévalence des anticorps anti-VHC et des marqueurs du virus de l'hépatite B chez les assurés sociaux du régime général de France métropolitaine, 2003-2004. Ann Intern Med. Janvier 2005.
47. Gregory L, Armstrong MD, Annemarie W, Edgar P, Geraldine M, Quillan Mc et al. The Prevalence of Hepatitis C Virus Infection in the United States, 1999 through 2002 FREE. Ann Intern Med. 2006; 144(10):705-14 doi: 10.7326/0003-4819-144-10-200605160-00004.
48. Zeller H, Rabarijaona L, Rakoto-Andrianarivelo M, Boisier P. Prévalence de l'infection par le virus de l'hépatite C en population générale à Madagascar. Virologie. Janvier 1997.
49. Randriamanantany ZA. Prevalence and trends of hepatitis C virus among blood donors in Antananarivo from 2003 to 2009. Transfusion Clinique et Biologique. 2012(19):52-6.
50. Andriamandimbisoa TH. Séroprévalence du VIH, VHB, VHC et syphilis chez les donneurs de sang au CNTS d'Antananarivo 2014. [Thèse]. Médecine Humaine: Antananarivo; 2014: 50.

51. Matheï C, Buntinx F, Damme V. Seroprevalence of hepatitis C markers among intravenous drug users in western European countries: a systematic review. *JVH*. May 2002 doi: 10.1046/j.1365-2893.2002.00339.
52. Crofts N, Jolley D, Kaldor J, Ingrid B.A Wodak. Epidemiology of hepatitis C virus infection among injecting drug users in Australia. *JECH*. 1997; 51:692-7 doi:10.1136/jech.51.6.692.
53. Ingrid B, Robyn Dwyer, Gregory J. Kehui L, John M Kaldor. Infection with HIV and hepatitis C virus among injecting drug users in a prevention setting: retrospective cohort study. *BMJ*. 1998; 317 doi:<http://dx.doi.org/10.1136/bmj.317.7156.433>.
54. MacDonald MA, Wodak AD, Dolan KA, Beek I, Cunningham PH, Kaldor JM. Hepatitis C virus antibody prevalence among injecting drug users at selected needle and syringe programs in Australia, 1995-1997. *MJA*. 2000; 172(2): 57-61.
55. Garfein RS, Vlahov D, Galai N, Doherty MC, Nelson KE. Viral infections in short-term injection drug users: the prevalence of the hepatitis C, hepatitis B, human immunodeficiency, and human T-lymphotropic viruses. *AJPH*. May 1996; 86; 5: 655-61 doi: 10.2105/AJPH.86.5.655.
56. Loma E, Lawrence J, Ronald H, Susan L, Ian T, John W. Risk of Hepatitis C Virus Infection among Young Adult Injection Drug Users Who Share Injection Equipment. *AJPH*. November 2001.
57. Hoek J, Haastrecht H, Goudsmit J, Wolf F. Prevalence, Incidence, and Risk Factors of Hepatitis C Virus Infection among Drug Users in Amsterdam. *Gastro enterol Clin Biol*. April 1990.

58. Rebecca J, Shenghan L, Jinbing Z, Wei L, Jie C, David V et al. Rapid transmission of hepatitis C virus among young injecting heroin users in Southern China. *International Epidemiological Association*. 2004. 33; 1.
59. Nino D, IMBS J, Melenotte G, Doffoel M. Dépistage et traitement des hepatitis C par le réseau des microstructures médicales chez les usagers de drogues en Alsace, France, 2006-2007. *BEH*. 2009 ; 37 : 4-8.
60. Lamontagne F. Madagascar: une épidémie VIH particulière? Journée Scientifique et Assemblée Générale de Solthis. Juin 2009.
61. Hellström U B, Sylvan S P E, Decker R H, Sönnernborg A. Immunoglobulin M reactivity towards the immunologically active region sp75 of the core protein of hepatitis C virus (HCV) in chronic HCV infection. *J Med Virol*. 1993; 39: 325-32.
62. EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. Consensus Statement. *J Hepatol*. 1999; 30: 956-61.
63. Fried MW, Hadziyannis SJ, Shiffman M, Messinger D, Zeuzem S. Rapid virological response is a more important predictor of sustained virological response (SVR) than genotype in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. 2008; 48: 5.
64. Ferenci P, Bergholz U, Laferl H, Scherzer TM, Maieron A, Gschwantler M et al. 24 weeks treatment regimen with peginterferon alpha-2a (40 kDa) (Pegasys) plus ribavirin (Copegus) in HCV genotype 1 or 4 "super-responders". *J Hepatol*. 2006; 44: 6.
65. Payan C, Raimbert A, I. Fouchard-Hubert I, Kouyoumdjian S, Lunel-Fabiani F. Analyse quantitative des anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C (VHC) : application au diagnostic d'infection chronique par le VHC. *Ann Biol Clin*. Mai 2003; 61(3).

66. Kim YS, Lee HS, Ahn YO. Factors associated with positive predictability of the anti-HCV Elisa method with confirmatory RT-PCR. *J Korean Med Sci.* 1999 ; 14 : 629-34.
67. Deparis X, Louis FJ, Rey P, Merlin M. Que sait-on de la prévalence de l'hépatite virale C en Afrique? *Med Trop.* 1996; 56: 117-121.
68. Gorgi Y, Yalaoui S, Ben H.L, Azzouz M.M, Hsairi M, Khelifa H.B et al. Dépistage de l'hépatite virale C dans la population générale en Tunisie. *Santé publique.* 1998 ;1902 : 401-4.
69. Guirlet FX. L'hépatite à virus C : les strategies thérapeutiques actuelles et en essais cliniques, place du pharmacien d'officine dans le conseil et la prise en charge des patients. [Thèse]. Médecine en pharmacie : Lorraine ; 2012 : 114.
70. Pol S. New recommendations for diagnosis and virological monitoring of viral hepatitis. *Gastro enterol Clin Biol.* 2003; 27:89.
71. Zeba TA. Coïnfection du virus de l'hépatite C et du virus de l'immunodéficience humaine chez les femmes enceintes au centre médical Saint-Camille de Ougadougou. [Thèse]. Sciences de la vie et de la terre : Burkina Faso ; 2009 : 59.
72. Loubna E. Aspects épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques des hépatites virales au Maroc. [Thèse]. Pharmacie : Maroc ; 2002 : 58.
73. Lunel F, Mariotti M, Cresta P. Comparative study of conventionnal and novel strategies for the detection of hepatitis C virus RNA in serum: amplicor, branched-DNA, NASBA and in house PCR. *J Virol Methods.* 1995; 54:159-71.
74. Bustin. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *JME.* 2000; 25: 169-93.

75. Scott JD, Gretsch DR. Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection: a systematic review. *Jama*. 2007; 297: 724–32.
76. Pawlotsky JM, Bouvier-Alias M, Hezode C. Standardisation of hepatitis C virus RNA quantification. *Hepatology*. 2000; 32: 654-9.
77. Lunel F, Mariotti M, Cresta P. Comparative study of conventionnal and novel strategies for the detection of hepatitis C virus RNA in serum: amplicor, branched-DNA, NASBA and in house PCR. *J Virol Methods*. 1995; 54:159-71.
78. Medici MC, Furlini G, Rodella A, Fuertes A, Monachetti A, Calderaro A. Hepatitis C virus core antigen: analytical performance, correlation with viremia and potential applications of a quantitative, automated immunoassay. *J Clin Virol*. 2011; 51: 264-9.
79. Wagner M, Huber M, Berg T, Hinrichsen H, Rasenack J, Heintges T et al. Peginterferon-alpha-2a (40KD) and ribavirin for 16 or 24 weeks in patients with genotype 2 or 3 chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2005 ; 129 : 522-7.
80. Tedeschi V, Seeff LB. Diagnostic tests for hepatitis C: where are we now? *Ann Intern Med*.1995; 123: 383-5.
81. Berg T, von Wagner M, Nasser S, Sarrazin C, Heintges T, Gerlach T et al. Extended treatment duration for hepatitis C virus type 1: comparing 48 versus 72 weeks of peginterferon-alfa-2a plus ribavirin. *Gastroenterology*. 2006; 130: 1086-97.
82. Sanchez-Tapias JM, Diago M, Escartin P, Enriquez J, Romero-Gomez M, Barcena R et al. Peginterferon-alfa2a plus ribavirin for 48 versus 72 weeks in patients with detectable hepatitis C virus RNA at week 4 of treatment. *Gastroenterology*. 2006;131: 451-60.



83. Chemello L. Persistent hepatitis C viremia predicts late relapse after sustained response to interferon-a in chronic hepatitis C. *Ann Intern Med.* 1996; 124: 1058-60.
84. Lau D, Kleiner D, Ghany M, Park Y, Schmid P, Hoofnagle J. 10-year follow-up after interferon-a therapy for chronic hepatitis C. *Hepatology.* 1998. 28: 1121-7.
85. Pol S, Jaffredo F, Nalpas B, Sayada C, Berthelot P, Bréchet C. Predictive value of HCV viremia after 3 months in the monitoring of antiviral treatments. *Hepatology.* 1994; 20 (2): 159 (abstract).
86. Gervais A, Bacq Y, Bernuau J. Decrease in serum ALT and increase in serum HCV RNA during pregnancy in women with chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2000 ; 32: 293–299.
87. Pessoa MG, Terrault NA, Detmer J. Quantitation of hepatitis G and C viruses in the liver: Evidence that hepatitis G virus is not hepatotropic. *Hepatology.* 1998; 27(3): 877-80.
88. Ferenci P, Bergholz U, Laferl H, Scherzer TM, Maieron A, Gschwantler M et al. 24 weeks treatment regimen with peginterferon alpha-2a (40 kDa) (Pegasys) plus ribavirin (Copegus) in HCV genotype 1 or 4 “super-responders”. *J Hepatol.* 2006; 44: 6.

## VELIRANO

« Eto anatrehan'i Andriamanitra Andriananahary, eto anoloan'ireo mpampianatra ahy sy ireo mpiara-nianatra tamiko eto amin'ity toeram-pampianarana ity ary eto anoloan'ny sarin'i HIPPOCRATE,

Dia manome toky sy miniana aho fa hanaja lalandava ny fitsipika hitandrovana ny voninahitra sy ny fahamarinana eo am-panantontosana ny raharaham-pitsaboana. Hotsaboiko maimaimpoana ireo ory ary tsy hitaky saran'asa mihoatra noho ny Rariny aho, tsy hiray tetika maizina na oviana na oviana ary na amin'iza na amin'iza aho mba hahazoana mizara aminy ny karama mety ho azo.

Raha tafiditra an-tranon'olona aho dia tsy hahita izay zava-miseho ao ny masoko, ka tanako ho ahy samirery ireo tsiambaratelo aboraka amiko ary ny asako tsy avelako atao fitaovana hanantontosana zavatra mamofady na hanamoràna famitàn-keloka.

Tsy ekeko ho efitra hanelanelana ny adidiko amin'ny olona tsaboiko ny anton-javatra ara-pinoana, ara-pirenena, ara-pirazanana, ara-pirehana ary ara-tsaranga.

Hajaiko tanteraka ny ain'olombelona na dia vao notorontoronina aza, ary tsy azo mampiasa ny fahalalako ho enti-manohitra ny lalàn'ny maha-olona aho na dia Vozonana aza.

Manaja sy mankasitraka ireo mpampianatra ahy aho ka hampita amin'ny taranany ny fahaiza nanoraisiko tamin'izy ireo.

Ho toavin'ny mpiara-belona amiko anie aho raha mahatanteraka ny velirano nataoko. Ho rakotry ny henatra sy horabirabin'ireo mpitsabo namako kosa aho raha mivadika amin'izany. »

**PERMIS D'IMPRIMER**

LU ET APPROUVE

Le Directeur de Thèse

Signé : Professeur RAZANAKOLONA Lala Rasoamialy-Soa

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Le Doyen de la Faculté de Médecine d'Antananarivo

Signé : Professeur ANDRIAMANANARIVO Mamy Lalatiana

**Name and first name :** RAFARAMALALA Solofo Sarah

**Title of the thesis :** VIRAL HEPATITIS C AND PCR AMONG INJECTION  
DRUG USERS IN MADAGASCAR

**Category:** BIOLOGY

**Number of pages:** 45

**Number of figures:** 15

**Number of annexes:** 06

**Number of bibliographical references:**

88

### **SUMMARY**

**Introduction:** Infection by the HCV is a public health problem because WHO estimates that 200 million subjects are infected worldwide, representing a prevalence of 3%. This is a serious pathology chronic course in 80% of cases of liver cirrhosis and responsible about 10-15 years in 10% of cases. Also, 150 million people are chronic carriers with 3 to 4 million new cases annually and 35,000 annual deaths. The injection drug users are a major reservoir of this HCV and this study is the first study of injection drug users in Madagascar.

**Methods and Results:** It was a retrospective and descriptive study lasting one month and 10 days, from 17 January 2012 to 27 February 2012. We analyzed all data registered among injection drug users at SLNR or Service de Laboratoire National de Reference in Antananarivo including ELISA optical density, rate of viral and area of Madagascar. Rates were calculated by using Excel 8.0 and Epi Info version 2013. In this study, we included 526 injection drug users, 6.46% were positive by ELISA including 2.94% by PCR. The optical density of the ELISA is associated with the rate of viral load and the Analamanga region is most concerned.

**Conclusion:** HCV infection among injection drug users screening reduces the reservoir of infection by PCR technique and remains the best technique for screening and to decide the treatment.

**Keywords:** diagnosis - HCV - PCR - treatment – injection drug users

**Director of the thesis :** Professor RAZANAKOLONA Lala Rasoamialy-Soa

**Reporter of thesis :** Doctor RANDRIAMAHAZO Rakotomalala Toky

**Author's address :** Lot VT1 TER VBA Andohaniato Ambohipo

**Nom et prénoms :** RAFARAMALALA Solofo Sarah

**Titre de la thèse :** L'HEPATITE VIRALE C A TRAVERS LA PCR CHEZ LES  
USAGERS DE DROGUES INJECTABLES A MADAGASCAR

**Rubrique :** BIOLOGIE

**Nombre de pages :** 45

**Nombre de figures :** 15

**Nombre d'annexes :** 06

**Nombre de références bibliographiques :** 88

## **RESUME**

**Introduction :** L'infection par VHC pose un problème de santé publique car l'OMS estime que 200 millions de sujets sont infectés dans le monde, soit une prévalence de 3%. C'est une pathologie grave à évolution chronique dans 80% des cas et responsable de cirrhose hépatique sur 10 à 15 ans dans 10% des cas. Les usagers de drogues injectables constituent un des principaux réservoirs de ce VHC et cette étude constitue la première étude de l'hépatite virale C chez les drogués à Madagascar.

**Méthodes et résultats :** Il s'agit d'une étude rétrospective descriptive sur une période de 1 mois et 10 jours, allant du 17 janvier 2012 au 27 février 2012. Les données proviennent des fiches d'enregistrement des usagers de drogues injectables au Service de Laboratoire National de Référence à Antananarivo. Nous avons étudié les paramètres densité optique de l'ELISA, charge virale de la PCR, région de Madagascar. Les données ont été traitées avec Excel 8.0 et Epi Info version 2013. Nous avons colligé 526 usagers de drogues injectables, 6,46% sont positifs par ELISA dont 2,94% par PCR. La densité optique de l'ELISA est en rapport avec le taux de la charge virale et que la région d'Analamanga est la plus concernée.

**Conclusion :** Le dépistage de l'infection par VHC chez les usagers de drogues injectables permet de réduire le réservoir de cette infection ainsi la technique par PCR reste la meilleure technique pour le dépistage et pour trancher le traitement.

**Mots clés :** diagnostic – HVC- PCR - traitement – usagers de drogues injectables

**Directeur de thèse :** Professeur RAZANAKOLONA Lala Rasoamialy-Soa

**Rapporteur de thèse :** Docteur RANDRIAMAHAZO Rakotomalala Toky

**Adresse de l'auteur :** Lot VT1 TER VBA Andohaniato Ambohipo